الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr.Yahia FARES de MEDEA

Faculté des Sciences
Département des sciences de la nature et de la vie

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة الدكتور يحي فارس بالمدية

كلية العلوم
قسم علوم الطبيعة والحياة

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de Master

En sciences de la nature et de la vie

Spécialité : ***Ecologie et protection de l'environnement.***

Thème :

Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. sur *Fusarium* sp. et *Erwinia amylovora*

Présenté par :

Chaib Hocine

Touzout Nabil

Soutenue le : 19/06/02017

Devant le jury composé de :

Président : Mostefaoui Houda	Grade : MCB	Etablissement : U. Médéa
Examinateur 1 : Licir Mourad	Grade : MAB	Etablissement : U. Médéa
Examinateur 2 : Chaouati Karima	Grade : Magister	Etablissement : CFPA de Médéa
Co-encadreur : Bouchenafa Hadjer	Grade : Master	Etablissement : Biologiste
Invité d'honneur : Abbabcia Amel	Directrice de la SRPV de Boufarik	

Année universitaire 2016/2017

Résumé :

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. L'extrait aqueux a été obtenu par décoction ainsi que l'extraction d'huile essentielle de *R. officinalis*, il a été réalisé par la méthode d'hydrodistillation.

Le test de l'activité antifongique sur deux souches de *Fusarium* (*Fusarium* de blé et d'agrume) et de l'activité antibactérienne sur une souche bactérienne *(Erwinia amylovora)* est basé sur la méthode de diffusion en milieu gélosé et de contact direct.

Les résultats de l'activité antifongique de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* ont donné un faible taux d'inhibition sur la sporulation et un fort effet sur la germination des deux souches de *Fusarium sp*.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, l'extrait aqueux possède un faible effet inhibiteur sur *Erwinia amylovora*.

En outre, les résultats montrent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* possède une activité antibactérienne moyen avec des diamètres d'inhibition varie entre 7.38mm et 12.71mm en comparaison avec l'activité antifongique qui atteindre un taux d'inhibition moyen (57.92%).

Mots clés : activité antimicrobiennes, inhibition, *Rosmarinus officinalis,* huile essentielle, extrait aqueux, hydrodistillation.

Abstract

This study aims to evaluate the antimicrobial activity of the water extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis*. Aqueous extract was obtained by decoction as well as extraction of essential oil from *Rosmarinus officinalis*, it was carried out by the method of hydrodistillation

The test of the antifungal activity on two strains of *Fusarium* sp (*Fusarium* of wheat and citrus) and antibacterial activity on a bacterial strain (*Erwinia amylovora*) is based on the diffusion method in medium agar and direct contact.

The results of the antifungal activity of the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* gave a low rate of inhibition on sporulation and a strong effect on the germination of the two strains of *Fusarium* sp.

As regards the antibacterial activity, the aqueous extract has a weak inhibitory effect on *Erwinia amylovora*.

In addition, the results show that the essential oil of *Rosmarinus officinalis* possesses an average antibacterial activity with inhibition diameters varies between 7.38 mm and 12.71 mm in comparison with antifungal activity which reach a medium inhibition range (57.92 %).

Keywords: antimicrobial activity, inhibition, *Rosmarinus officinalis*, essential oil, aqueous extract, hydrodistillation.

ملخص :

تهدف هذه الدراسة الى تقييم النشاط المضاد للمكروبات للمستخلص المائي وللزيت الاساسي من اكليل الجبل *Rosmarinus officinalis*.

تم الحصول على المستخلص المائي باستعمال طريقة الغليان اما استخلاص الزيت الاساسي ل *Rosmarinus officinalis*فقد تم باستعمال طريقة التقطير بالبخار hydrodistillaton.

تم اختبار النشاط المضاد للفطريات على سلالتين من الفوزاريوم *Fusarium* (فوزاريوم القمح والحمضيات) والنشاط المضاد للبكتيريا على سلالة بكتيرية (*Erwinia amylovora*) عن طريق الانتشار على وسط جيلوزي والتلامس المباشر

نتائج النشاط المضاد للمستخلص المائي من اكليل الجبل قدم مستوى منخفض من تثبيط التبوغ و تثبيط عالي على انبات سلالتين الفوزاريوم.

فيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا فقد تبين بان المستخلص المائي له تأثير كابح بشكل منخفض على Erwinia amylovora

بالإضافة الى ذلك ، فان النتائج تشير الى ان الزيت العطري لإكليل الجبل لديه نشاط مضاد للبكتيريا متوسط بأقطار تثبيط تتراوح ما بين 7.38mm و 12.71mm بالمقارنة مع النشاط المضاد للفطريات الذي يصل الى معدل تثبيط متوسط 57.92%.

الكلمات المفتاحية : النشاط المضاد للمكروبات، تثبيط،*Rosmarinu officinalis* ، الزيت الاساسي ، مستخلص مائي ، التقطير بالبخار.

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail

Nous remercions notre encadreur de son grand aide durant la réalisation de notre travail, il est orienté nous vers le succès avec ses connaissances et partageants des idées et aussi l'encouragement tout on long de notre épreuve, comme il a été présent à tout moment qu'on à besoin de lui : M. Abderrezak Chaouch. Et Melle Hadjer Bouchenafa (Co- encadreur)

Nous remercions les membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail.

Nous remercions également :

Madame Abbabcia Amel Directrice de la SRPV Boufarik.
Mademoiselle Saddek Dounia Ingénieur de laboratoire de bactériologie de la SRPV Boufarik,
Mademoiselle Bencheikh khadidja Ingénieur de laboratoire de Mycologie de la SRPV Boufarik.

Nous remercions tous les membres de l'équipe de laboratoires de la SRPV de Boufarik pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

En fin, tous ceux qui ont pratiqué de près ou de loin par la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce travail aux plus chères personnes qui ont largement Contribué à ma réussite durant toutes mes années d'étude : Ma Mère Fatima et mon père Mohamed.

A mes sœurs Samira, Saliha, Khadîdja et loubna.

A mes frères Rachid, Fathi, Hakim, Djamel, Adel, Bouzid et Imad

A tous mes Amis, ben Othman, Toufik, Faissal, Mohamed, Djamel, Zakaria. Hamza.Benyahia, Zoubir, Fathi, Abd Elaali, Fateh, Ahmed, Mostapha, Rabeh, Mounir, Youcef, Sohaib.Mokhtar, Mahfoud.

A tous mes amis de la promotion d'écologie2016/2017.

A tous ceux dont l'absence n'exclut pas leur présence dans mon cœur.

Hocine

Dédicace

A ma chère mère

Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier à sa juste valeur L'être qui a consacré sa vie à parfaire notre éducation avec Un dévouement inégal associé à beaucoup de sacrifice.

Puisse Dieu m'aider pour rendre un peu soit-il De ce que vous m'avez donné ! Puisse Dieu vous garder longtemps auprès de nous et vous bénir infiniment !

A mon cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, Le respect et l'amour que je vous porte.

Que Dieu, le tout puissant, vous couvre de Sa Sainte miséricorde et

Vous accueille dans son éternel paradis « Amine ».

A mes chers frères et sœur

Touzout Abdelhalim, Sohaib et Zineb

A La Famille Touzout

Je ne saurais vous remercier pour tout le soutien que vous m'avez accordé, vous avez toujours été présent pour moi. Puisse Dieu vous accorder santé et prospérité!

A mes amis et confrères

Du Début à la fin vous avez été présent. Vous m'avez accueillie avec

Sincérité, Et j'ai eu le privilège de trouver une deuxième famille à vos côtés.

A tous ceux qui me sont chers. A toutes les personnes non citées et qui savent que je pense à eux. A tous les musulmans.

Nabil

Liste des figures

Figure 1 : Production et superficie occupées par les principales céréales dans le monde en 2010 4

Figure2 : Production des agrumes en Algérie de l'année 2013..... 5

Figure3 : Morphologie du *Fusarium solani*..... 6

Figure4 : Symptômes de la fusariose sur céréales..... 7

Figure5 : Différents types de spores de *F. graminearum*..... 8

Figure6: Cycle de vie de *F. graminearum*, principal agent responsable de la fusariose des épis de blé 9

Figure7 : cycle de vie de la maladie du feu bactérien..... 13

Figure8 : La cellule de la bactérie Erwinia amylovora au microscope électronique GX 1 8.000..... 14

Figure9 : schéma de La structure de l'enveloppe de la cellule d'une bactérie Gram Négative..... 15

Figure10 : Aspects morphologiques du *Romarin*..... 18

Figure11 : Station Régionale de la Protection des Végétaux de Boufarik..... 20

Figure12 : dépôts de suspension bactérienne sur lames (IF)..... 26

Figure13 : Principe de la méthode de diffusion par disque..... 32

Figure14 : résultat d'isolement, (B) souche blé dur, (A) souche d'agrumes..... 34

Figure 15 : aspects des Colonies *d'Erwinia amylovora*, sur milieu levane (A), sur milieu KB (B)..... 35

Figure 16 : Résultat test de Potasse (KOH) 3%..... 36

Figure 17 : Résultat du test coloration de Gram- 36

Figure18 : Résultat de l'activité cytochrome oxydase……... 37

Figure 19 : Résultat du test catalase…….. 37

Figure 20 : Observation de fluorescence sur King B…….. 38

Figure 21 : Résultat de métabolisme du glucose, A) aprèsl'ensemencement, B) avant l'ensemencement (témoins)……. 38

Figure 22 : Résultat de production d'indole par les bactéries……..... 39

Figure 23 : Test de croissance à 39° (A), et (B) croissance sur température ambiant……... 39

Figure 24 : Résultat positive de l'arginine dihydrolase…….. 40

Figure 25 : Résultat de développement de bactérie sur milieu LEVANE…….. 40

Figure 26 : Résultat d'hypersensibilité sur tabac, A) Témoin négatif inoculée à l'eau distillée stérile, B) après 72 h d'inoculation, C) après 5 jours d'inoculation…….. 41

Figure 27 : développement de *Fusarium* de blé (B) et d'agrumes (A) sur l'extrait aqueux de *Rosmarinusofficinalis*…….. 43

Figure 28 : Effet des 2 doses d'extrait aqueux de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne des souches de *Fusarium*sp…… 44

Figure 29 : Sporulation de *Fusarium*sp sous l'effet d'extraits de *Rosmarinus officinalis*…… 45

Figure 30 : Effet d'extraits de *R. officinalis* sur le taux d'inhibition desporulation de *Fusarium*sp sous……. 45

Figure 31 : Effet de la concentration d'huile essentiel de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne de *Fusarium*sp……. 47

Figure 32 : Effet de l'huile essentiel de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne des 2 souches de blé (A) et des agrumes (B)……..... 48

Figure 33 : Comparaison entre le développement des 2 doses (B50% et A100%) *d'Erwiniaamylovora* sur le milieu levane avec le témoin 53

(A)……

Figure 34 : Développement d'*Erwinia amylovora* sur le milieu liquide…….. 54

Figure 35 : Effet de déférente concentration *(*A=100%), (B= 75%), (C=50%) et (D=25%), (E=témoin) l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur le développement d'Erwinia *amylovora*……. 55

Figure 36 : Zones d'inhibition pour *Erwinia amylovora*…… 55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités…….. **33**

Tableau 2 : Les caractères macroscopiques des souches de *Fusarium* sp…..... **34**

Tableau 3 : Les résultats des tests d'indentification…….. **42**

Tableau 4 : Rendement et caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*…….. **46**

Tableau 5 : Résultats de l'activité antifongique d'HE de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* de blé et des agrumes……..…….. **47**

Tableau 6 : Coefficients d'ajustement (huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp de blé)…… **49**

Tableau 7 : Paramètre du modèle (huile essentiel de *Rosmarinusofficinalis*sur *Fusarium*sp de blé)…….. **49**

Tableau 8 : Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % (huile essentiel de *Rosmarinusofficinalis*sur *Fusarium*sp de blé)……..... **50**

Tableau 9 : Classement des groupes homogènes des moyennes de la croissance mycélienne de la souche de blé par l'huile essentiel de *R.officinalis* par rapport aux différentes concentrations…… **50**

Tableau 10 : Coefficients d'ajustement (huile essentiel de *Rosmarinusofficinalis* sur *Fusarium*sp d'agrumes)…….... **51**

Tableau 11 : Paramètre du modèle (huile essentiel de *Rosmarinusofficinalis* sur *Fusarium*sp d'agrumes)…….... **51**

Tableau 12 : Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de

confiance à 95,00 % (huile essentiel de *Rosmarinusofficinalis* sur *Fusarium*sp d'agrumes)**……...** **52**

Tableau 13 : Classement des groupes homogènes des moyennes de la croissance mycélienne de la souche d'agrumes par l'huile essentiel de *R.officinalis* par rapport aux différentes concentrations**…….** **52**

Tableau 14 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des dilutions pour *Erwinia amylovora* **……..** **54**

Tableau 15 : Coefficients d'ajustement (huile essentiel de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora****)…….....*** **56**

Tableau 16 : Paramètre du modèle (Huile essentiel de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora*)**…….** **57**

Tableau 17 : Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % (Huile essentiel de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora*)**……..** **57**

Tableau 18 : Classement des groupes homogènes des moyennes des zones d'inhibition de croissance d'*E.amylovora* par l'huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* par rapport aux différentes concentrations**…….....** **58**

LISTE D'ABRÉVIATION

µl	Microlitre
µm	Micromètre
AFNOR	Association Française de normalisation.
C	concentration.
Cm	Centimètre
CMI	concentration minimale inhibitrice.
D	Dose
FsA	*Fusarium* d'agrumes
FsB	*Fusarium de blé*
H.E	huile essentielle.
HR	Hypersensibilité
IC	inhibition de croissance mycélienne.
IF	Immunofluorescence
IG	inhibition de germination.
INRA	institue nationale de recherche agronomique
Is	inhibition de sporulation.
KB	King B
KOH	hydroxyde de potassium.
LPS	Lipopolysaccharides
min	Minutes
Ml	Millilitre
mm	Milimètre
Na Oh	hydroxyde de sodium
nm	Nanomètre
PBS	solution saline tamponnée au phosphate10 mM (PBS), pH 7,2
PDA	potatose dextrose agar
Rd	Rendement
SRPV	station régionale de protection des végétaux
T	Témoin
ufc	Unité forment colonne
UV	Ultra-violet

Sommaire

Introduction générale……..…… **1**

Chapitre I : Synthèse bibliographiques……. **3**

I.1 - Présentations des Plante hôte …… **3**

I .1.1- Généralités sur la culture de blé dur ……. **3**

I .1.1.1- Caractéristiques morphologiques ……... **3**

I .1.1.2- Classification de blé dur…… **3**

I .1.1.3- Importance du blé dans le monde …….. **3**

I.1.2- Généralités sur les agrumes…… **4**

I.1.2.1- Classification ……... **4**

I.1.2.2-Importance économique des agrumes en Algérie ……..... **5**

I.1.3- Généralité sur le pommier *Malus domestica* ……..... **5**

I.1.3 .1- Classification …….. **6**

I.2- Généralité sur les agents phytopathogènes …… **6**

I.2.1- Taxonomie et morphologie de *Fusarium* …… **6**

I.2.2- La *Fusariose* ……... **7**

I.2.2.1- Symptômes …….. **7**

I.2.2.2- Caractéristiques du pathogène …… **7**

I.2.2.3- Le cycle de vie …….. **8**

I.2.2.4- Les sources d'inoculum…… **8**

I.2.2.5. Infection…… **9**

I.2.1.6- Conditions favorables au développement de la maladie ……. **9**

I.2.1.7- Méthodes de luttes …….. **10**

I.2.2- Généralités sur la maladie du feu bactérien …… **11**

I.2.2.1- Le feu bactérien : une maladie sporadique ……. **11**

I.2.2.2- Symptômes ……. **11**

I.2.2.3- Cycle de maladie ……. **12**

I.2.2.4- Agent causal (*Erwinia amylovora)*…… **13**

I.2.2.5- Gamme d'hôte du feu bactérien …….. **14**

I.2.2.6- Stratégie de lutte contre le feu bactérien……. **15**

I.3 - Généralités sur Le Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) **16**

I.3.1- Classification du Romarin ……. **16**

I.3.2- Description botanique de romarin…….. **16**

I.3.3- Composition chimique de romarin …… **17**

I.3.4- Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin ……. **18**

Chapitre II : Matériel et Méthodes…… **19**

II.1. Lieu d'étude …… **19**

II.2- Matériel biologique …….. **19**

II.2.1- Matériel phytopathogènes ……... **19**

II.2.2- Matériel végétal ……. **19**

II.2.3- Matériel de laboratoire ……. **20**

II.3- Méthodes de travails…… **20**

II.3.1- Isolement et identification des isolats phytopathogènes …….. **20**

II.3.1.1- Isolats fongiques …… **20**

II.3.1.2- Souche bactérienne …… **20**

II.3.2- Préparation des extraits de romarin « *Rosmarinus officinalis* »…….. **26**

II.3.2.1- Préparation de l'extrait aqueux de romarin …….. **26**

II.3.2.2- Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*…… **27**

II.3.3- Activité *in vitro* de l'extrait aqueux de romarin sur l'isolat de champignon……. **28**

II.3.3.1- Etude du pouvoir antifongique *in vitro* de l'extrait aqueux du romarin …….. **28**

II.3.3.1.1- Inhibition de la croissance mycélienne ……. **28**

II.3.3.1.2- Inhibition de la sporulation et de la germination ……. **29**

II.3.3.1.3-Analyses statistiques ……. **30**

II.3.4-Activité *in vitro* de l'extrait aqueux de romarin sur l'isolat de bactérie…… **30**

II.3.4.1- Méthode de contacte directe …….. **30**

II.3.4.2- Méthode de dilution ……. **30**

II.3.5.1-Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis*……. **31**

II.3.5.2-Analyse statistique……. **33**

Chapitre III : Résultats et Discussions…….. **34**

III.1-Résultats…….. **34**

III.1.1-Description morphologique des souches de *Fusarium* sp ……..... **34**

III.1.2. 1- Isolement et obtention des isolats d'*Erwinia amylovora* …… **34**

III.1.2. 2-Descriptions morphologiques des colonies d*'Erwinia amylovora* ……..... **34**

III.1.2.3-Identification d'*Erwinia amylovora*……..... **35**

III.1 .2.3.1-Tests Biochimiques……..... **35**

III.1.2.3.2-Test biologique …….. **41**

III.1.2.3.3-Test sérologique…… **41**

III.1.4- Etude de l'effet *in vitro* de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes ……..... **43**

III.1.4.1- Etude de l'effet *invitro* de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes ……..... **43**

III.1.4.2-Evaluation de l'activité antifongique d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes……..... **46**

III.1.4 .2.1-Rendement en huile essentielle et caractères organoleptiques ……. **46**

III.1.4.2.2- Evaluation de l'activité antifongique d'huile essentielle de *R. officinalis*……... **47**

III.1.4.2.3- Analyse statistique …….. **49**

III.1.5-Etude de l'effet in vitro de l'extrait aqueux de *R. officinalis* sur développement d'*E. amylovora* et Evaluation de l'activité antibactérienne *invitro* d'huile essentiel de *R. Officinalis*…….. **55**

III.1.5. 1-Etude de l'effet in vitro de l'extrait aqueux *R. officinalis* sur développement d'*E. amylovora* …… **55**

III.1.5.2- Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* d'huile essentiel de *R. Officinalis*…….. **56**

III.1.5.2.1- Analyse statistique ……... **57**

III.2- Discussion …….. **61**

III.2.1- Effet d'extrait aqueux de *R. officinalis* sur *Fusarium*sp de blé et des agrumes ….. **61**

III.2.2- Effet d'huile essentiel de *R. officinalis* sur *Fusarium*sp de blé et des agrumes…… **62**

III.2.3- Identification des isolats d*'E.amylovora* …… **63**

III.2.4- Effet de l'extrait aqueux de *R. officinalis* sur *Erwinia amylovora* ……..... **63**

III.2.5- Effet d'huiles essentiel de *R. officinalis*sur *E.amylovora* …… **64**

Conclusion générale …… **66**

Introduction

La production agricole est constamment menacée par les ravageurs et les microorganismes présents dans leur environnement. Des études ont pu estimer largement que 10% des récoltes sont perdues à cause des maladies **[1].** Parmi ces maladies, on peut citer les maladies fongiques et les maladies bactériennes.

Les maladies fongiques non contrôlées peuvent entrainer des effets catastrophiques comme la fusariose, qui affecte les rendements mais aussi la qualité sanitaire de la récolte par la présence de toxines dans les grains. Cette maladie endémique, est provoquée par un complexe d'espèces de champignons phytopathogènes, le « complexe fusarien », à large spectre d'hôtes. L'espèce principale responsable de la fusariose des épis et inclue dans le genre *Fusarium* dont *Fusarium graminearum* **[2].**

Les maladies bactériennes sont responsables de pertes économiques considérables dans plusieurs pays. Comme l'exemple de feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* est l'une des bactéries phypathogènes les plus destructives causant d'importantes pertes économiques pour la production de poires, de cognasse et de pommes au niveau mondial **[3].**

La difficulté de lutte contre les maladies par les pesticides de synthèse expliquerait l'usage abusif de ces produits phytosanitaires par les producteurs. En conséquence, cet usage abusif des pesticides pose un problème de rentabilité de culture, de risque de résidus de produits de synthèse dans les fruits et de pollution de l'environnement **[4].**

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de micro-organisme, de prédateurs, de parasitoïdes et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides **[5].**

L'Algérie, à l'instar de nombreux pays du monde, recèle un patrimoine floristique important qu'il soit utile d'explorer et de valoriser en utilisant les substances bioactives issues du métabolisme secondaire des plantes, dans différents domaines comme la mise au point de nouvelles formulations de biopesticides **[6].**

A cet effet, on s'est intéressé à l'une des espèces de la famille des Lamiacées : le romarin (*Rosmarinus officinalis*), est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de mettre en évidence le pouvoir antifongique et antibactérien de diverses concentrations d'extraits aqueux et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur la régression de *Fusarium* de blé et des agrumes, ainsi sur la bactérie responsable de la détérioration des pommiers (*Erwinia amylovora*), comme substances naturelles alternatives à la lutte chimique utilisée en agriculture.

Le présent travail comprend trois chapitres. Le premier portera sur les données bibliographiques sur les cultures infectées, sur le champignon phytopathogènes en cause, le feu bactérien et le romarin. La seconde porte sur le matériel et les méthodes de travail adoptés. Le troisième est consacré aux résultats et discussions sur :

- Effet de l'extrait aqueux et l'huile essentiel de romarin sur le *Fusarium* de blé et des agrumes

- Effet de l'extrait aqueux et l'huile essentiel de romarin sur le feu bactérien.

I.1 – Présentations des Plante hôte :

I .1.1- Généralités sur la culture de blé dur :

I .1.1.1- Caractéristiques morphologiques :

Le blé se présente comme une plante herbacée à feuilles assez larges **[7].** La tige ou chaume ne commence à prendre son caractère de tige qu'au début de la montaison Celle-ci, d'abord pleine, devient creuse sauf au niveau des nœuds qui restent pleines **[8].**

Les feuilles sont alternées, ligulées et engainantes **[7].** Elles ont des nervures parallèles et sont terminées en pointe **[8].** L'inflorescence est toujours en épillets associés en inflorescence complexe, épis ou grappes d'épillets, se recouvrant étroitement les uns aux autres. La fécondation est autogame. Le fruit est un caryopse ou grain **[8 ; 7].** Les racines sont de type fasciculé peu développées ; 55 % du poids total des racines se trouvent entre 0 et 25 cm de profondeur **[8].**

I .1.1.2- classification de blé dur :

Nom scientifique : ……*Triticum turgidum* (synonyme : *Triticum durum*)
Règne……végétale
Embranchement…….....Stomatifères
Sous-embranchement…….....Angiospermes
Classe……Monocotylédones
Ordre……Glumales
Famille……Graminées :(graminacées), (Poacées)
Genre……..…Triticum
Espèce : ..... *Triticum turgidum* L.

I .1.1.3- Importance du blé dans le monde :

Les céréales, le blé en particulier occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35% de la production mondiale**.** Le blé arrive juste derrière le riz et le mais si l'on considère les tonnages produits **[9].** (Figure1)

L'Algérie est un grand importateur de blé et se trouve dépendante du marché international. Cette situation risque de se prolonger à plusieurs années, faute de rendements insuffisants et des besoins de consommation sans cesse croissants devant une forte évolution démographique **[10].**

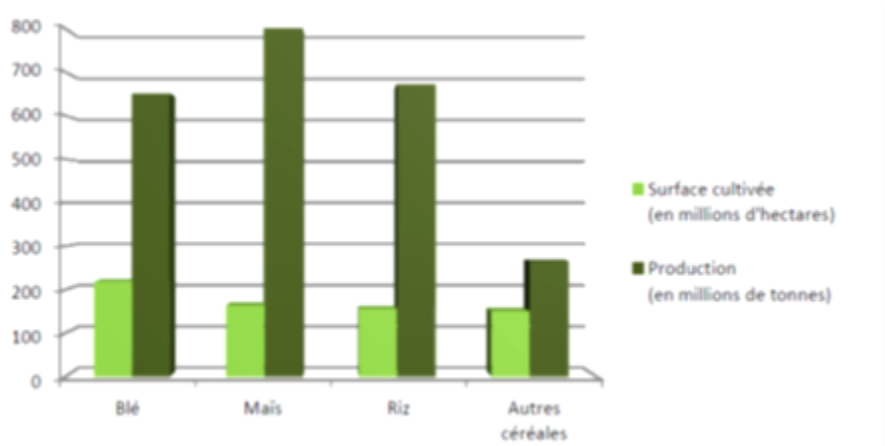


Figure 1 : Production et superficie occupées par les principales céréales dans le monde en 2010 **[9].**

I.1.2- Généralités sur les agrumes :

Les agrumes sont originaires du sud-est de l'Asie, bien que leur culture a probablement commencé en Chine **[11].** Selon **[12],** la détermination du centre d'origine des agrumes se complique du fait que l'hybridation naturelle interspécifique et intergénérique est très fréquente dans ce groupe et crée des espèces que Tanaka appelle éléments secondaires qui se reproduisent par semis. Avec le rayonnement des civilisations chinoises au cours du premier millénaire avant notre ère, la culture des agrumes commence à se propager dans les pays avoisinants : sud du Japon et archipel de Malaisie.

I.1.2.1-classification :

La taxonomie proposée par Swingle **[12]** est :

Famille : ……. Rutaceae

S, Famille : …… Aurantiodeae

Triba : ……... Citrae

S/tribu : ……. Citrinae

Groupe : …… Eucitrus

I.1.2.2- Importance économique des agrumes en Algérie :

Les agrumes présentent une importance économique considérable pour de nombreux pays, n'en est de même pour l'Algérie où ils constituent une source d'emploi et d'activité économique aussi bien dans le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (conditionnement, emballage, transformation et transport, …) **[13].**

Cette culture revêt une importance stratégique pour l'Algérie comme source d'approvisionnement en fruits et des débouches sur le marché international des produits agrumicoles. Sur le plan social la culture des agrumes emploi en moyenne 140 jours ha an. Sans compter ceux générés par l'environnement de ce secteur (transformation, commercialisation) (figure 2) **[14].**

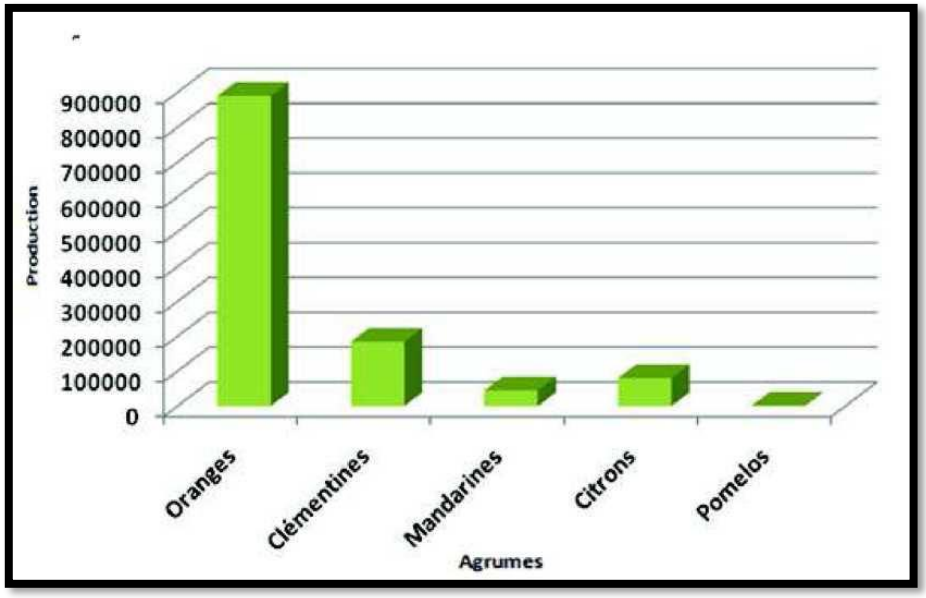


Figure 2 : Production des agrumes en Algérie de l'année 2013 **[15].**

I.1.3- Généralité sur le pommier *Malus domestica* :

La pomme compte parmi les fruits de climat tempéré les plus répandus. C'est du point de vue botanique un piridion (c'est-à-dire un fruit portant une rosette sur le bas, et un pédoncule marqué). C'est un fruit arrondi, de forme quasi sphérique, de 10 à 15 cm de diamètre environ, et de couleur différente selon les variétés et les conditions de végétation. Sa couleur à maturité s'étend du vert « pomme » au rouge plus ou moins foncé en passant par une grande diversité d'intermédiaires vert pâle, jaune, orangé ou de couleurs plus ou moins panachées **[16].**

I.1.3 .1- Classification : Le pommier appartient : **[17 ; 18]**

Ordre : …… Rosales,
Famille : ……. Rosacées,
Sous-famille : …… Maloideae
Genre : ……*Malus.*
Espèce : .....*Malus domestica*

I.2- Généralité sur les agents phytopathogènes :

I.2.1- Taxonomie et morphologie de *Fusarium* :

La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809. Il doit son nom du latin *fusus* (fuseau) en rapport à la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées. Il appartient à la division des Ascomycètes et à la famille des Nectriacées **[19].**

Le *Fusarium* se multiplie par voie végétative ou par l'intermédiaire de spores asexuées. Cette forme imparfaite (anamorphe) est caractérisée par un mycélium septé et ramifié **[20].** Le *Fusarium* produit trois types de spores asexuées(figure), des ***microconidies*** unicellulaires ou bicellulaires arrondies ou ellipsoïdales, des ***macroconidies*** pluricellulaires en forme de croissant et des ***chlamydospores*** arrondies d'une ou deux cellules entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée **[21 ;22 ;23].**

La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante chez les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces **[24].**

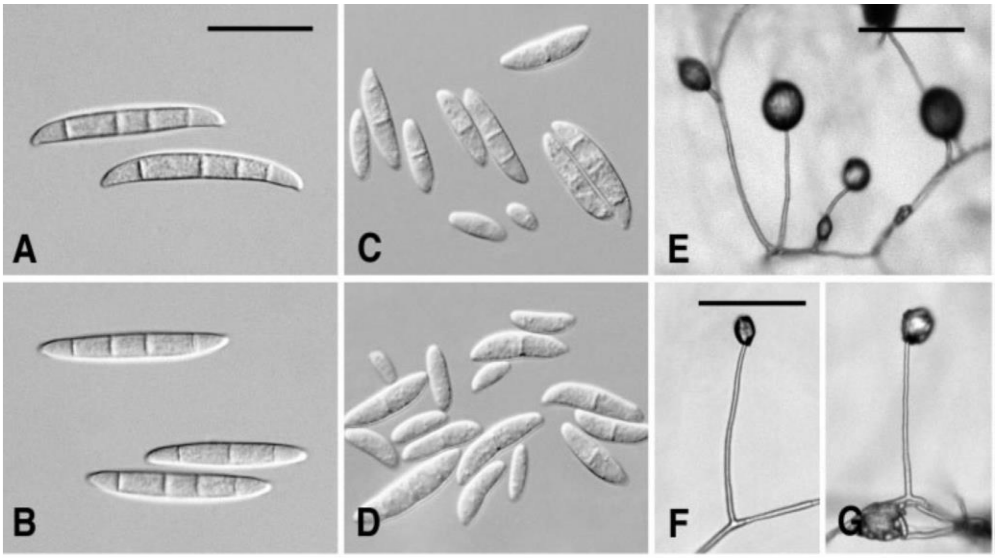


Figure 3 : Morphologie du *Fusarium solani* **[19]**

A – B : Macroconidies ; **C – D** : Microconidies ; **E – G** : Conidiophores et microconidies

- Barres d'échelle : **A – D** = 25 µm ; **E** = 100 µm ; **F – G** = 50 µm.

I.2.2-La fusariose :

La fusariose est une maladie fongique causée par le *Fusarium* sp qu'on trouve sur toute une gamme d'hôtes, dont le blé, l'orge, l'avoine, le maïs, le seigle et les herbages graminées et les agrumes **[25 ; 26 ; 27].** L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables telles que l'avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains et à l'altération de la qualité des grains **[28 ; 29 ; 30].** En plus des pertes de production, certaines espèces de *Fusarium* présentent sur les céréales peuvent conduire à la contamination des grains par diverses mycotoxines **[28 ; 30].**

I.2.2.1- Symptômes :

La fusariose des épis de blé est caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée, les épis apparaissent alors blanchâtres (figure 3-A). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose (Figure 3-B). Si l'infection est plus tardive, les grains peuvent être de taille normale mais ils se décolorent en rose. **[31].**

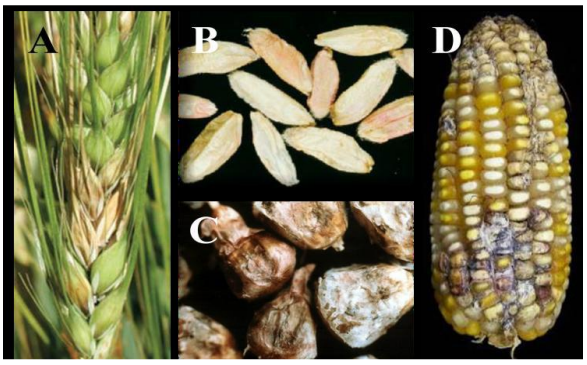


Figure 4 : Symptômes de la fusariose sur céréales : épis de blé avec des grains fusariés (A), grains de blés ridés et rosâtres (B), grains de maïs fusariés (C), épi de maïs fusarié (D) **[31].**

I.2.2.2- Caractéristiques du pathogène :

L'espèce principale responsable de la fusariose des épis et inclue dans le genre *Fusarium* présenté précédemment est *F. graminearum*. **[32 ; 33 ; 34 ;35].**

Le *Fusarium graminearum* est un champignon cosmopolite, retrouvée en Asie, en Europe, en Afrique, en Amérique du Nord et du Sud et en Océanie **[36].**

Le pathogène apparaisse sous le microscope sous forme des macroconidies qui mesurent généralement entre 25 - 50µm ~ 2.5 - 5.0 µm et comportent trois à sept cloisons. Le

corps de la spore est généralement droit ou faiblement arqué, la cellule apicale est courbe et pointue. La cellule basale est allongée, effilée et légèrement courbée (Figure 4). Des périthèces superficiels naissent souvent sur les épis et les chaumes malades quand la récolte a lieu durant une longue période humide et chaude **[37 ; 26].**

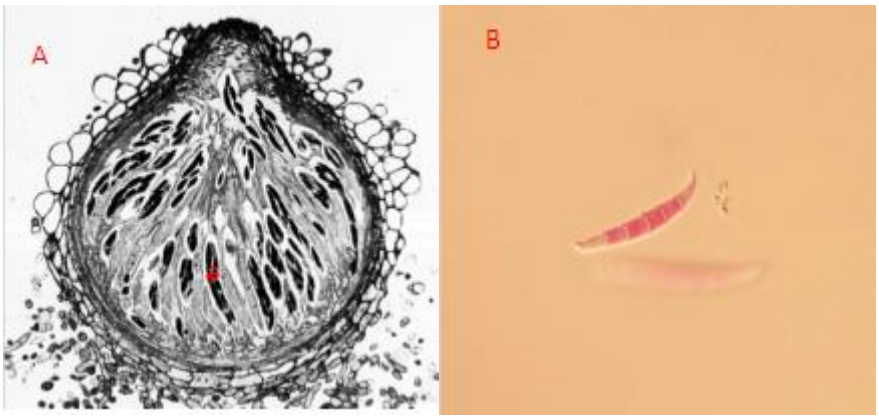


Figure 5 : Différents types de spores de *F. graminearum*.
(A) Périthécium contenant les ascospores (a) (**B)** Macroconidie isolée **[38].**

I.2.2.3- Le cycle de vie *:*

Le cycle de vie des agents pathogènes responsables de fusariose est illustré dans la Figure 5 par le cycle de *F. graminearum*. Pendant l'hiver et tout au long du cycle cultural, les agents pathogènes responsables de la fusariose des épis survivent dans le sol sous forme de chlamydospores **[39].** Cet inoculum primaire est capable d'infecter les émis et induire une fonte des semis (*seedlingblight)* et une pourriture du collet (*foot rot*) **[40].**

L'inoculum est formé principalement de macroconidies ou microconidies (phases télomorphes *Fusarium* et *Micro dochium*) et d'ascospores (phases anamorphes *Gibberella* et *Mono graphella*) qui sont produites en conditions humides et chaudes **[41 ; 42 ; 39].** Les ascospores et les conidies sont dispersés par le vent **[43].** Ou par splashing (dispersion par la pluie de feuille en feuille). Les conditions les plus propices à l'infection sont des périodes de 48 à 72 heures de forte humidité et des températures de 24 à 30 °C. Des périodes plus longues d'humidité élevée combinées à des températures fraîches peuvent aussi provoquer l'infection. Les infections qui se produisent tôt dans la saison produisent parfois des spores qui, transportées par le vent, peuvent propager la maladie **[37 ; 44 ; 45 ; 26].**

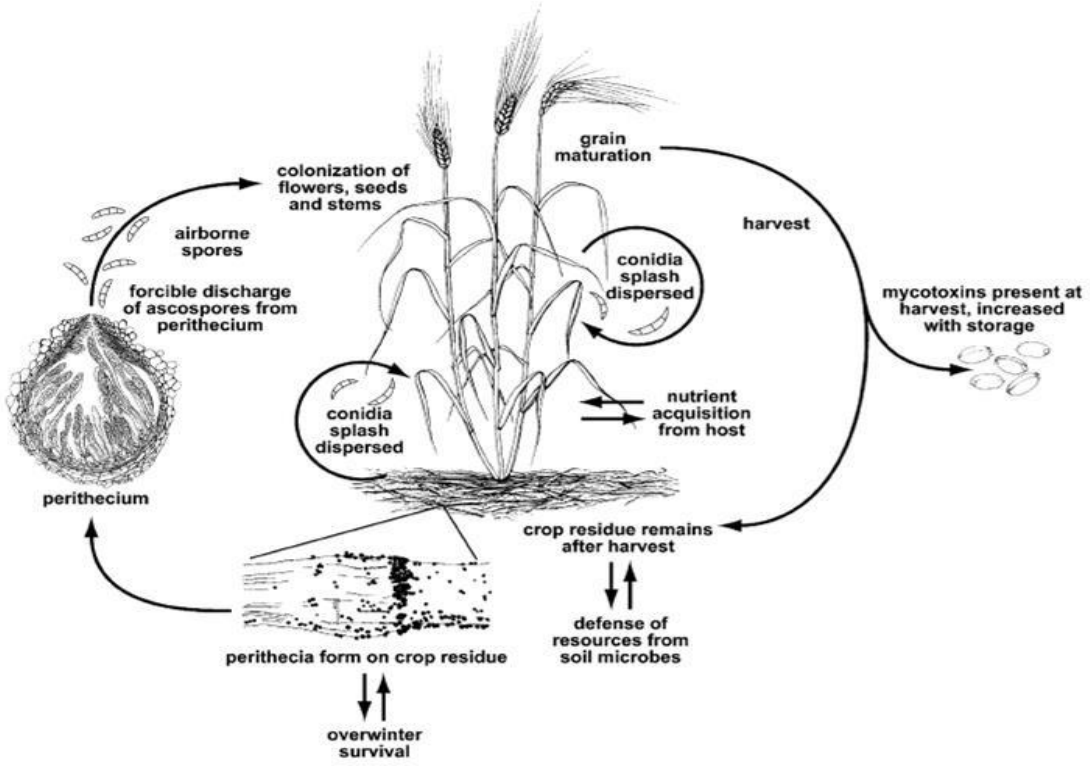


Figure 6: Cycle de vie de *F. graminearum*, principal agent responsable de la fusariose des épis de blé **[46].**

I.2.2.4- Les sources d'inoculum :

- Les résidus de culture infectés l'année précédente (source principale) : et en particulier les tissus qui se dégradent plus difficilement comme les nœuds **[42 ; 47].** La survie des champignons sur résidus peut atteindre plus de 2 ans après récolte ce qui les classe en « source à long terme ». Lorsque les résidus restent en surface, la survie de l'inoculum est plus **[33 ; 48].**
- Les semences infectées : lors des infections sur épi, le mycélium attaque les grains à travers les glumes, pénètre dans le péricarpe, l'albumen, voire l'embryon. Cette source inoculum permet à la maladie de se développer dès l'automne **[41].**
- Les plantes hôtes (*Agrostis, Bromus, Medicago, Festuca*…), peuvent également jouer le rôle de réservoir de *Fusarium* sans présenter de symptômes visibles **[49 ; 42].**

I.2.2.5. Infection :

La fusariose de l'épi de blé est donc initiée par le dépôt de spores matures sur des épis de blé en leur. Ces spores germent, colonisent les anthères extrudées, généralement dans la partie médiane de l'épi, où commence la floraison et où l'humidité est supérieure à celle des

autres épillets **[50 ; 49].** Ils entrent dans la fleur et se développent afin de rejoindre la graine en formation, les bractées florales et le rachis. La pénétration dans l'épi peut également avoir lieu en surface des glumes ou via des ouvertures naturelles (stomates, blessures, base de l'épillet) **[51 ; 42].**

I.2.2.6- Conditions favorables au développement de la maladie :

La sévérité de la fusariose est conditionnée par trois facteurs indépendants des champignons :Les facteurs climatiques, agronomiques et physiologiques de la plante hôte**[39].**

a. Les facteurs climatiques

Les facteurs climatiques, en particulier l'humidité et la température, jouent un rôle primordial puisqu'ils vont conditionner la germination et l'infection du champignon. Chaque espèce responsable de la fusariose a un optimum de température et d'humidité différents **[41 ; 52].**

b. Les facteurs agronomiques :

Ils jouent un rôle principalement dans la conservation de l'inoculum primaire. Ainsi, un précédent cultural sensible à la fusariose (maïs, blé, orge), infecté lors de son cycle, est une source potentielle d'inoculum pour la culture suivante via ses résidus. Egalement, le travail du sol augmenterait la dégradation des résidus en favorisant l'activité microbienne et donc limiterait la colonisation des résidus par *F. graminearum* **[33].**

c. Les facteurs physiologiques :

L'intensité de la maladie dépend non seulement de la quantité d'inoculum initial et de la virulence des souches pathogènes, mais aussi des caractéristiques physiologiques de la plante (taille, densité d'épillets…), son état de stress, son stade de développement, la date et la durée de la floraison et le niveau de résistance de la variété **[34 ; 42 ; 39 ; 48].**

I.2.2.7- Méthodes de luttes :

a. Les pratiques culturales :

Les pratiques culturales à savoir la destruction des débris de récolte des plantes fusariées, la jachère de longue durée, la rotation culturale avec des cultures non- hôtes, peuvent agir sur la densité de l'inoculum présent dans le sol **[53 ; 54].** Néanmoins, la rotation des cultures est impraticable sur le plan économique où l'agriculture intensive est hautement spécialisée **[55]** De plus, il est connu que des formes spéciales comme melonis, ciceris et

lentis peuvent coloniser d'autres plantes sans provoquer de symptômes apparents, ce qui rend impossible l'éradication de la maladie par la pratique des cultures en rotation **[20].**

b. La résistance variétale :

Comme pour de nombreuses maladies, la méthode la plus efficace pour le contrôle des maladies provoquées par *Fusarium* est l'utilisation des cultivars résistants s'ils sont disponibles **[56].** Des gènes de résistance vis – à – vis des *Fusarium* existent chez beaucoup d'espèces végétales et ont été introduits par sélection dans des variétés cultivées. Ainsi, chez la tomate, le melon, le haricot et le pois chiche des gènes dominants de résistance ont été identifiés **[57 ; 58 ; 59 ; 60 ;61].**

Cependant, l'efficacité des variétés résistantes dans le contrôle d'une maladie peut être sérieusement limitée par la variabilité de la pathogénicité, y compris l'apparition de nouvelles races pathogènes et pathotypes par des mutations ou des parasexualités aléatoires et spontanées **[62 ; 63 ; 64].**

c. La lutte chimique :

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons pathogènes. Certains fongicides systémiques peuvent contrôler partiellement les maladies dû aux *Fusarium* **[65 ; 66 ; 67].** L'augmentation de l'utilisation des fongicides provoque plusieurs effets négatifs comme le développement de la résistance des agents pathogènes. Ces fongicides ont aussi un effet néfaste sur l'environnement **[68].**

d. La lutte biologique :

La lutte biologique avec *des Trichoderma* spp. Antagonistes contre les agents phytopathogènes telluriques est une alternative potentielle à la lutte chimique **[69].** Des espèces de *Trichoderma* ont démontrés leurs efficacités dans le contrôle des maladies de la pourriture racinaire de nombreuses plantes cultivées **[70].**

La meilleure approche permettant de lutter efficacement contre la fusariose serait donc une approche intégrée combinant de bonnes pratiques culturales, l'utilisation de variétés tolérantes ainsi qu'une application fongicide à la bonne dose et au bon stade de développement de la plante **[71].** Toutefois, l'amélioration des pratiques culturales reste le levier de lutte le plus efficace contre la fusariose de l'épi.

I.2.2- Généralités sur la maladie du feu bactérien :

I.2.2.1- Le feu bactérien : une maladie sporadique :

Le feu bactérien est causé par la bactérie *E. amylovora*, qui est un organisme nuisible réglementé. Elle peut causer la mort d'un arbre en une seule saison. Cette maladie systémique affecte plusieurs espèces appartenant principalement à la sous-famille des *Maloideae*, famille des *Rosaceae*. Elle est sans doute la maladie la plus grave affectant le poirier, pommier, cognassier et d'autres arbres ornementaux dans de nombreux pays **[72].**

C'est une maladie sporadique qui peut provoquer des dommages considérables, car elle est nécrogène et évolue très rapidement. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et de ce que l'attaque de feu bactérien puisse avoir comme répercussions sur plusieurs années.

I.2.2.2- Symptômes :

Les symptômes provoqués par le feu bactérien peuvent être observés sur différentes parties de l'arbre, mais les premières expressions de symptômes sont tout d'abord caractérisées par des gouttelettes suintantes puis d'un exsudat sur les pédicelles des fleurs. L'infection progresse ensuite vers le bas du pédicelle et dans toutes les fleurs d'un bouquet **[72].** Tout d'abord, la bactérie infecte les fleurs, qui se fanent, puis flétrissent et brunissent. Les pédoncules peuvent également apparaître imbibés d'eau, deviennent vert foncé, et enfin brun ou noir, parfois avec des gouttelettes suintantes d'exsudat bactérien **[73].** Les bouquets floraux et les feuilles se flétrissent et se dessèchent pour ensuite prendre une texture ressemblant à du cuir **[73 ; 74].** Puis, la bactérie se propage à l'arbre et les symptômes les plus typiques sont alors visibles sur les jeunes rameaux en pleine croissance, qui une fois atteints se flétrissent et se courbent en forme de canne à leur extrémité. Souvent, et suivant les variétés, des fruits immatures se momifient et restent attachés à l'arbre toute la saison, et l'hiver suivant **[74 ; 73].**

I.2.2.3- Cycle de maladie :

La bactérie se dissémine à partir de lésions actives via des insectes pollinisateurs pendant la période de floraison, ou grâce à des phénomènes physiques (vent, pluie…). Elle pénètre dans l'hôte par des ouvertures naturelles (nectaires, stomates) ou accidentelles (blessures) en période de floraison ou de croissance des pousses. Une fois dans l'apoplaste, elle se multiplie préférentiellement dans les tissus jeunes en croissance, ce qui peut se traduire par l'apparition à leur surface de gouttelettes d'exsudat, mélange de polysaccharides

bactériens et de cellules bactériennes. Cet exsudat permet une rapide dissémination de la maladie. Les tissus atteints se nécrosent, les rameaux et les feuilles flétrissent et se dessèchent. La bactérie peut envahir l'ensemble de la plante en se multipliant dans les espaces intercellulaires du parenchyme cortical mais elle peut aussi atteindre les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux ascendant de sève **[75].** La maladie peut se transmettre très facilement d'une plante à l'autre par l'intermédiaire de l'exsudat.

En fin de croissance végétative, il se forme des chancres sur les branches ou le tronc, dans lesquels la bactérie peut se conserver pendant la période de repos végétatif. Elle reprend sa multiplication au printemps suivant. La gravité de la maladie reste difficile à prédire. De fortes épidémies peuvent être suivies de plusieurs années sans attaque ou avec de faibles attaques si les conditions climatiques sont défavorables à la maladie. (Figure 6).

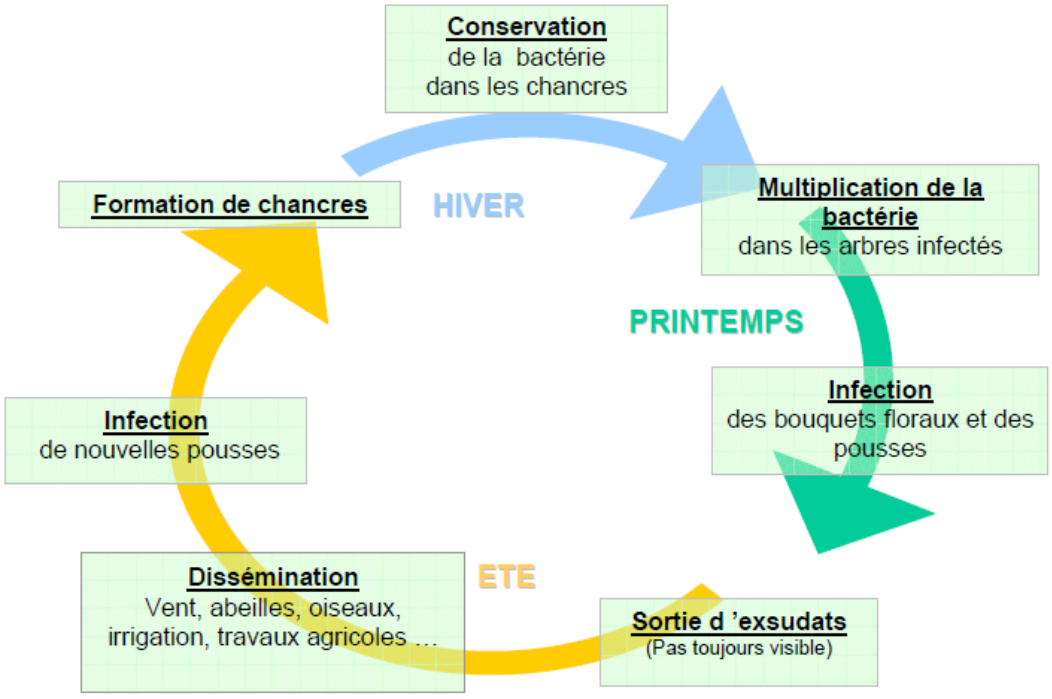


Figure 7 : cycle de vie de la maladie du feu bactérien **[76].**

I.2.2.4- L'agent causal (*Erwinia amylovora):*

L'espèce *E. amylovora* est reconnue comme étant la première bactérie phytophatogène observée, en 1884 à l'aide du postulat de Koch's **[77].**

- **Classification : [78].**

Règne : …… Eubacteria

Phylum : ……. Proteobacteria

Classe : …….. Gammaproteobacteria

Ordre : …… Entrobacteriales

Famille : ……. Enterobacteriaceae

Genre : …….. Erwinia

Espèce : ……. *Erwinia amylovora*.

- **La morphologie :**

E. amylovora est un bâtonnet court, de dimensions 1,1-1,6 x 0,6-0,9 µm, Gram-négatif, **[79].**à extrémités arrondies (figure 7). Les cellules sont souvent individuelles, ne forment pas de chaîne cellulaire, ne possèdent pas d'endospores et sont mobiles par des flagelles peritriches. **[80].**



Figure 8 : La cellule de la bactérie *Erwinia amylovora* au microscope électronique GX 1 8.000 **[81].**

Les composants cellulaires

- Lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont les composés majoritaires de surface chez les bactéries à Gram négatif, il s'agit de macromolécules tripartites composées d'un lipide (le lipide A) ancré dans la membrane

externe, d'un oligosaccharide (ou « core ») et d'un polysaccharide appelé antigène-O (ou chaine O) **[82]. (Figure 8)**

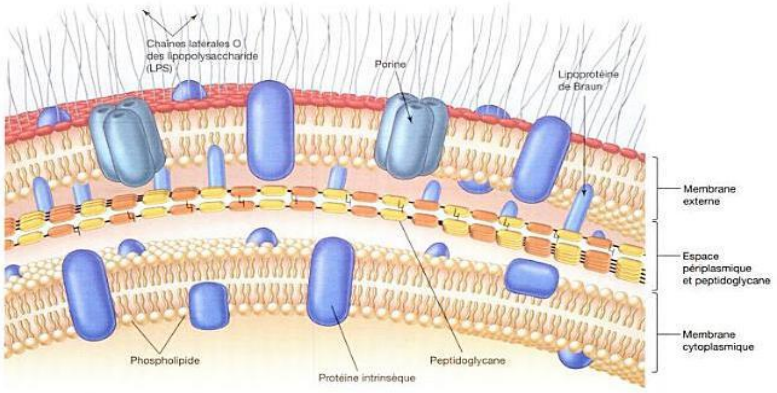


Figure 9 : schéma de La structure de l'enveloppe de la cellule d'une bactérie Gram Négative **[83].**

- **Plasmide :**

Erwinia amylovora héberge un plasmide circulaire de 29 kb appelé pEA29, qui est présent presque chez toutes les souches d'*E.amylovora* **[84 ; 85 ; 86 ; 87].** Ce plasmide ne peut pas être transmis par conjugaison **[88].** Et particulièrement stable et résistant aux traitements physiques et chimiques **[87].**

I.2.2.5- plantes hôtes du feu bactérien :

L'espèce *E. amylovora* est une bactérie redoutable qui affecte la famille des Rosaceae. Elle possède une très large gamme d'hôte à l'intérieur de cette famille **[89 ; 90].**

La sous famille des Maloideae est la plus fragile puisqu'elle détient plusieurs espèces très sensibles à la maladie. Ladite sous famille comprend aussi des espèces à grande valeur économique. Les genres : Pyrus, Malus, Cydonia, Eryobotria, Cotoneaster, Crataegus, Pyracantha et Sorbus, appartenant à cette sous famille, sont considérés comme étant les plus cultivés au monde en plus d'être les hôtes les plus communs de la maladie **[77].**

I.2.2.6- Stratégie de lutte contre le feu bactérien :

- **Lutte culturale :**

Plusieurs possibilités s'offrent au producteur pour limiter les pertes dues au feu bactérien :

L'élimination des chancres peut être réalisée avant la saison printanière en éliminant les foyers par curetage dans le bois sain, ou en éliminant la branche porteuse. Puis dès l'apparition des symptômes, il faut éliminer rapidement les foyers d'infection pour limiter la propagation de la maladie, en coupant les pousses au moins 30 à 40 cm en amont des symptômes, éventuellement à l'aide de sécateurs stériles. Il existe des risques de contagion par les outils qui peuvent être réduits en les utilisant dans du bois sain et par temps sec. Les branches coupées sont ensuite jetées au centre des rangs puis fauchées. **[74; 91].**

- **Lutte génétique :**

Chez le pommier et le poirier, un programme de création variétale par hybridation classique pour la résistance au feu bactérien a été entrepris depuis plusieurs années en France à l'INRA d'Angers et aux USA à l'Université Cornell (Geneva). Ces programmes de recherche consistent à faire produire à la plante :

- Des substances antibactériennes **[92].**
- Des substances inhibitrices de facteurs du pouvoir pathogène **[93].**
- Des protéines-cibles d'effecteurs modifiés **[94].**

- **Lutte biologique :**

Dans le cas du feu bactérien, la production des antibiotiques et la compétition pour l'espace et les nutriments sont considérés les principaux mécanismes employés par les antagonistes bactériens pour lutter contre *Erwinia amylovora* **[95;96; 97].**Actuellement, plusieurs produits à base des organismes antagonistes sont disponibles ou en cours de développement pour la gestion de la maladie du feu bactérien, ils comprennent les souches de *P. agglomerans* et *Bacillus subtilis* et des levures comme *A. pullulans, Candida sake, et Metschnikowia pulcherrima*. **[98].** *P. fluorescens* est devenu le premier antagoniste disponible dans le commerce pour la gestion du feu bactérien **[96].**

I.3 - Généralités sur Le Romarin (*Rosmarinusofficinalis* L.) :

Le Romarin est une plante des coteaux arides garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au Sud jusqu'aux confins sahariens depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font bruler dans leurs chambres en période d'examens **[99].**

I.3.1- Classification du Romarin :

La classification botanique place le Romarin comme suit : **[100].**

Règne : ……végétal.

Sous-règne : ……Trachéophytes.

Embranchement : ……Spermaphytes ou Phanérogames.

Sous-embranchement : …...Angiospermes.

Classe : ……...Dicotylédones.

Sous-classe : ……...Asteridae.

Ordre : …… Lamiales.

Famille : ……..Lamiaceae.

Genre : ……Rosmarinus.

Espèce : ……..*Rosmarinus officinalis* L.

I.3.2- Description botanique de Romarin :

Le romarin est un arbrisseau de la famille des lamiaceae, très rameuse, très feuillée **[101].** En général, la plante mesure de 60 cm à 1,5m. Les feuilles persistantes ressemblent à de fines aiguilles ; leur face supérieure est vert foncé et leur face inférieure blanchâtre.Tige à l'écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, se divisant en rameaux opposés tortueux, nœuds distancés de 0,5 à 2 mm **[102].** De minuscules fleurs bleues pâle, lavande ou parfois blanches regroupés en petits bouquets **[103].**

Le calice en cloche, bilabié, poudré, blanchâtre, corolle en entonnoir, stigmate entier, 2 étamine fertiles. Akènes bruns groupés par 4. C'est une plante hermaphrodite ; floraison 4 fois par an : janvier, avril, juillet et octobre, polonisée par les insectes **[101].** Le romarin a une odeur légèrement camphrée et une saveur piquante. La récolte se fait pendant et après la floraison, moment où les feuilles sont le plus aromatiques (figure 9) **[103].**



Figure 10 : Aspects morphologiques du *Rosmarinus officinalis* **[104].**

I.3.3- Composition chimique de romarin :

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l'α-pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène.

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques :

L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage **[105]** et de la résine **[106].**

Le criblage phytochimique de l'extrait ethanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaemphérol **[107].**

I.3.4- Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin :

Cette plante est utilisée en médicine en raison de ses différentes propriétés :

- Antibactérienne :

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologiques. L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO2) supercritique du Romarin, a présenté un large spectre antimicrobien.la croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique **[108].**

- Antifongique :

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose**,** ont évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du Romarin, les résultats ont montré que ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les cinq levures (*Candida albicans, Rhodoto rulaglutinis, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae, Yarrowia lipoyitica*) examinées **[109].**

- Anti spasmolytiques, diurétiques, hépato protectrices, soulagement des désordres respiratoires **[110].**
- Antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives **[111].**
- Anti-inflammatoires, antimétastasiques **[112].**
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires **[113]** et la prolifération des tumeurs cutanées.
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse **[114].**
- Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) Alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 **[115].**

II.1. Lieu d'étude :

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de mycologie et de bactériologie de la Station Régionale de la Protection des Végétaux de Boufarik (Wilaya de Blida).

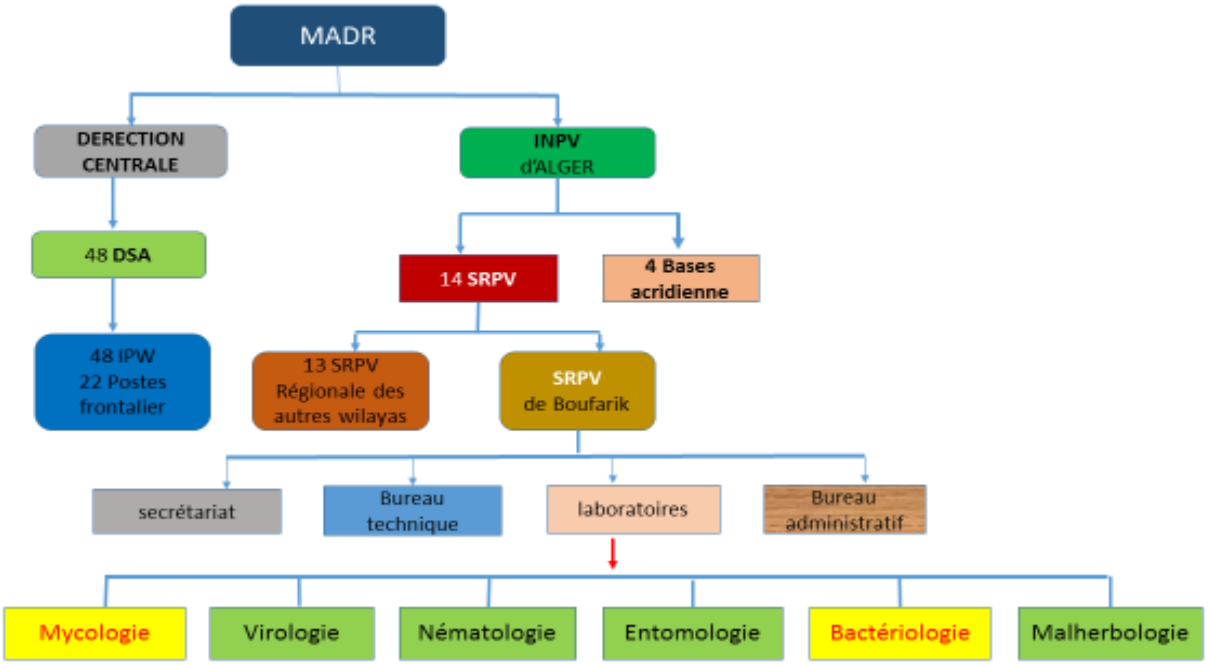


Figure11 : L'organigramme d'INPV de Boufarik.

II.2- Matériel biologique :

II.2.1- Matériel phytopathogènes :

a. Isolats fongiques

Le matériel fongique utilisé dans notre étude est constitué de deux isolats du genre *Fusarium* isolés à partir des plantules de céréales (blé dur) et des échantillons de rameaux d'agrumes (oranger variété Thompson) infectés lors des analyses de proximité de la SRPV de Boufarik**.**

b. Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée lors de notre expérimentation est représentée par *Erwinia amylovora* isolée à partir des fleurs, des pédoncules floraux et des rameaux de pommier infectés obtenues dans le cadre des analyses de proximité de la SRPV de Boufarik.

II.2.2- Matériel végétal :

Le matériel végétal est représenté par les feuilles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.). La collecte des plantes a été effectuée au début du mois de mars 2017 au niveau de la SRPV de

Boufarik ; le matériel végétal a été séché à l'obscurité et à la température ambiante dans un endroit sec et aéré.

II.2.3- Matériel de laboratoire :

Le matériel utilisé durant notre expérimentation : Verrerie, Réactifs et préparations, Les appareils **(Annexe I), (Annexe II).**

II.3- Méthodes de travails :

II.3.1- Isolement et identification des isolats phytopathogènes :

II.3.1.1- Isolats fongiques :

1) **Milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement des souches fongiques, est le milieu PDA (Potatos Dextros Agar), **(composition, Annexe 3).** Ce dernier est un milieu très favorable pour le développement des Champignons notamment ceux du genre *Fusarium* pour sa richesse en éléments nutritifs particulièrement le glucose et l'amidon. **[116].**

2) **Technique d'isolements :**

La technique consiste à rincer les échantillons représentés par les graines de Blé et les rameaux d'agrumes avec l'eau du robinet pour éliminer les débris des végétaux et du sol , en suite les passer dans un bain d'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 2°C pendant 4 minutes dans le but de l'élimination des souches saprophytes. Suite à cela, rincer les échantillons dans trois bains d'eau distillée stérile pendant 5 minutes chacun, ensuite les séchés sur papier wattman stérile.

Enfin, déposer les échantillons dans des boites de pétri contenant le milieu PDA a raison de cinq (05) graines ou fragments par boite ensuite fermées par parafilme. Les boites sont ensuite incubées dans l'étuve à une température de 25°C.

3) **Purification :**

La purification de ces champignons a été réalisée après repiquages consécutifs par transplantation des disques mycéliens de chaque isolat dans des boites de Pétrie contenants le milieu PDA.

II.3.1.2- Souche bactérienne :

1. **Milieu de culture :**

Le milieu de culture utilisé lors de notre travail et le milieu levane semi sélectif d'*E. amylovora*; **(composition, Annexe 3). [117].**

2. Echantillonnage et isolement de la bactérie :

Les parties de végétal présentant des symptômes typiques du feu bactérien ont été Sélectionner, désinfecter superficiellement à l'aide de coton imbibé d'alcool (éthanol à 70%) pour éliminer les souches saprophytes ; En suite ils ont été découper à l'aide d'un scalpel stérilisé en petit fragments et les déposé dans un flacon stérile dans le quel a été ajouté 2 ml d'eau physiologique stérile (0.85 %), suite à cela les laisser en macération environ 20 minutes, un agitateur Ping Ponge (**Annexe 2)** à la température ambiante.

L'isolement de la bactérie a été réalisé par étalement de la suspension végétale par épuisement en 3 secteurs à l'aide d'une pipette de Pasteur préalablement désinfectée dans de l'alcool (éthanol à 70°) et flambée. Les boite de pétri ont été incubées à 27°C pendant 48 h

3. Repiquage et identification :

Les colonies présentant des caractéristiques macroscopiques typiques d'*E. amylovora* ont été repiquées dans des boites contenant le milieu levane. Pour compléter leur identification.

3.1- Tests Biochimiques d'identification

- **Test à la potasse indicatrice du GRAM :**

Déposer une goutte d'une solution aqueuse à 3% de KOH sur une lame de microscopie. Faire une émulsion d'une anse de culture bactérienne âgée de 24 à 48 heures avec la solution. Le gram est considéré négatif s'il y a formation de filament en soulevant l'anse. Le gram est considéré positif en l'absence de filament. **[118].**

- **Test coloration de Gram :**

Cette méthode met en évidence des différences de structure, de composition chimique des parois bactériennes et leur réactivité vis-à-vis des colorants de GRAM.

La fixation de la bactérie à tester est réalisée à la chaleur et en présence d'une goutte d'eau distillée stérile après la préparation du frottis par étalement d'une culture bactérienne âgée de 24 heures sur une lame. Les frottis fixés sont d'abord colorés au violet de gentiane, suivi par l'application d'une solution de lugol. La décoloration est effectuée par un lavage des lames à l'alcool 95°.

Après un lavage abondant avec un jet d'eau distillée stérile, le frottis subit une deuxième coloration à l'aide d'une solution de fuschine basique. Ont réalisé ensuite une observation des frottis au microscope optique grossissement 1000 X. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs **[119].**

- **Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase :**

Déposer une goutte d'une solution aqueuse à environ 1% d'oxalate de N, N, diméthyl paraphénylène diamine, préparée extemporanément, sur du papier buvard. Faire une émulsion immédiate d'une anse de culture sur le buvard imbibé. Il est également possible d'utiliser des réactifs prêts à l'emploi (Dry slide oxidase™ par exemple) ou un autre dispositif équivalent. L'apparition d'une coloration rose violacée atteste de l'activité du cytochrome C oxydase. Dans ce cas le test est considéré positif. Le test est négatif en l'absence de coloration. **[120].**

- **Test catalase :**

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Sur une lame en verre stérile, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les isolats bactériens âgés de 24 heures sont déposés dans la solution de peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une anse à ensemencer en plastique stérile. Après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive. **[119].**

- **Test de fluorescence sur KB :**

Prélever une colonie âgée de 24 à 72 heures. Ensemencer en stries une boite de Pétri contenant du milieu KB. Incuber pendant environ 48 heures à 25°C (+/- 3°C) et révéler l'éventuelle fluorescence en éclairant la boite avec la lampe à UV dans une pièce noire. Le test est positif si apparition de fluorescence allant du vert au bleu. Il est négatif en l'absence de fluorescence. **[121].**

- **Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose :**

A l'aide d'un fil de platine stérilisé à la flamme, prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures). Ensemencer deux tubes gélosés contenant le milieu Hugh et Leifson par piqûre centrale. Mettre un des deux tubes en conditions d'anaérobiose en ajoutant une couche d'environ 1 cm d'huile de vaseline stérile à la surface du tube. Incuber pendant 48 à 72 heures à la température de 25°C (+/- 3°C).

  - Lorsque les deux tubes virent au jaune, la bactérie est dite « fermentative ».

- La bactérie « oxydative » du glucose n'acidifie pas le tube en anaérobiose (absence de changement de couleur) alors qu'une acidification débute à la surface du tube en aérobiose (couleur jaune).
- Les bactéries inertes ou inactives cultivent peu ou pas dans le tube en anaérobie. En aérobie, une culture est observée sans modification de pH ou avec une faible alcalinisation en surface (virage au bleu). **[122].**

Production d'Indole par les bactéries :

Une culture bactérienne âgée de 24 h sur le milieu Urée-indole liquide en tubes est déposée à l'aide d'une anse à ensemencer. A la suite de l'incubation, trois gouttes de réactif de Kovac sont ajoutées, la lecture est immédiate, la présence d'un anneau rouge en surface indique une production de l'indole par la bactérie à partir d'un acide aminé qui est le tryptophane **[123].** Le milieu d'Urée – indole est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'indentification de nombreux germes bactériens **[123]**

Croissance à 39°C :

A partir d'une culture bactérienne, une suspension bactérienne est préparée dans le milieu levane. Après incubation pendant 24 à 72h ; s'il y a développement de la bactérie le test est positif ; **[121].**

Test d'arginine Dihydrolase

Le test arginine dihydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine dihydrolase. Inoculer le milieu de culture semi-liquide arginine. Ajouter environ 1 cm d'huile minérale stérile. La réaction se fait en condition anaérobique. Incuber à 26° C pour 48 heures. Suite à l'incubation, lire la réaction obtenue. Une réaction positive indique qu'il y a eu transformation de l'arginine par l'enzyme arginine dihydrolase **[123].**

Test de mise en évidence de l'activité levane sucrose :

Prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures). Ensemencer en stries une boite de Pétri contenant du milieu levane. Incuber pendant environ48 heures à 25°C (+/- 3°C). L'apparition d'une culture abondante, bombée, muqueuse, blanche et brillante après 1 à 2 jours à 25°C± 3°C, indique une activité levane sucrase (test positif). En l'absence de ces caractéristiques, le test est négatif. **[124].**

3.2. Test biologique :

- **Test d'hypersensibilité et de pathogénicité sur tabac (HST) :**

Injecter une suspension bactérienne dense à environ 10^9 ufc/ml d'une culture jeune (24 à 48 heures) entre l'épiderme et le parenchyme palissadique d'une jeune feuille de tabac à l'aide d'une seringue. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 heures, une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée. Le test est négatif si aucune réaction n'est observée **[121].**

3.3. Test sérologique

- **Immunofluorescence (IF)**
- **Test d'immunofluorescence indirecte pour les bactéries pathogènes des plantes :**
  - **Préparation des tampons**

Les tampons doivent être préparés selon la recette du fournisseur du Kit s'il existe une recette, sinon on le prépare selon la recette standard la conservation est au maximum un mois.

- **Tampon IF [solution saline tamponnée au phosphate 10 mm (PBS), pH 7,2]**

Ce tampon est utilisé sur tout pour la dilution des anticorps **(Annexe 3)**

- **Préparation des échantillons**

Préparer des dilutions décimales (1/10, 1/100) de l'extrait de l'échantillon ou de la suspension bactérienne dans le tampon d'extraction ou le PBS.

Pour la suspension bactérienne ajouter la crème bactérienne à (03 ml) du tampon d'extraction ou au tampon PBS, agiter puis centrifuger 10 minutes à 1200 tours par minute. Jeter le surnageant et récupérer le culot et rajouter 1 à 3 ml de tampon d'extraction ou de PBS, refaire l'opération deux à trois fois.

Récupérer la solution mère et Préparer des dilutions décimales (1/10, 1/100).

- **Préparation des lames de test**

Marquer les références de l'échantillon et la date sur la lame par un crayon. Pipeter un volume standard mesuré (15 à 20 µl) est approprié pour le diamètre de puits de 6 mm - augmenter le volume pour les puits plus grandes de l'extrait d'échantillon de la solution mère de la suspension bactérienne et chaque dilution sur une rangée de fenêtres. La deuxième ligne peut être utilisée en double ou pour un second échantillon 2.

Déposer le même volume (15 à 20 µl) du témoin positif et du témoin négatif (tampon IF) en deux répétitions dans les puits.

- **Fixation des cellules bactériennes**

Fixer les cellules bactériennes sur la lame soit par flambage ou chauffage (30 min à une température maximale de 50 ° C) puis en recouvrant les puits (lame) avec de l'éthanol (>70% ou 95%) pendant 3 min ou selon des instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps puis sécher a l'air libre.

Les lames doivent être utilisées de préférence le plus tôt possible, mais si nécessaire, les lames fixées peuvent être conservées dans une boîte desséchée (jusqu'à un maximum de 3 mois) avant d'effectuer d'autres essais (Figure 11).

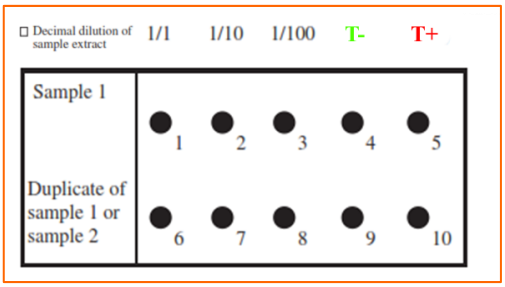


Figure 12 : dépôts de suspension bactérienne sur lames (IF).

- **IF- Procédure :**

Nous avons réalisé plusieurs préparations pour l'observation microscopique de la lame

- Préparer un ensemble de deux dilutions de l'anticorps (coating and conjugate) dans le tampon IF (PBS),
- Disposez les lames sur du papier absorbant humide. Couvrir complètement chaque puits de test avec la dilution d'anticorps. Le volume d'anticorps appliqué sur chaque fenêtre doit être au moins le volume d'extrait appliqué (15 à 20 µl).
- La procédure suivante doit être effectuée en l'absence d'instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps.
- Incuber les lames sur du papier humide sous un couvercle (obscurité) pendant 30 min (± 10 min) à température ambiante (18-25 ° C).
- Rincez soigneusement avec le PBS puis Laver en immergeant pendant environ 5 min dans du le tampon de lavage puis le tampon IF.

- Évitez de provoquer des transferts de gouttelettes qui pourraient entraîner une contamination croisée. Enlevez délicatement l'excès d'humidité en tamponnant la lame doucement.
- Disposez les lames sur du papier humide. Couvrir les puits avec la dilution de conjugué. Le volume de conjugué appliqué sur les puits doit être au moins le volume d'anticorps appliqué (15 à 20 µl).
- Incuber les lames sur du papier humide sous un couvercle pendant 30 min (± 10 min) à température ambiante (18-25 ° C).
- Rincer, laver et sécher la lame comme avant.
- Pipeter 5-10 µL de glycérol phosphate tamponné ou un anti-décolorant commercial sur chaque puits ou distribuer une quantité suffisante sur la lame, appliquer une lamelle couvre-objet et éviter l'exposition des lames à un excès de lumière.

➢ **Lecture du test IF**

Examiner les lames de test sur un microscope à épi fluorescence à l'aide de filtres et d'une source lumineuse appropriés, sous huile immersion ou glycérol à l'eau d'immersion à un grossissement de 500-1000 fois. Numérisez les puits sur deux diamètres et autour du périmètre. Pour les échantillons ne montrant pas ou un faible nombre de cellules, observer au moins 40 champs de microscope.

Observer les cellules fluorescentes brillantes avec la morphologie caractéristique de l'organisme cible dans les puits des échantillons à tester.

II.3.2- Préparation des extraits de romarin « *Rosmarinus officinalis* » :

II.3.2.1- Préparation de l'extrait aqueux de romarin :

L'extrait aqueux a été obtenu par décoction de 50 g de plantes séchées dans 500 ml d'eau distillée. Cette opération a été réalisée au niveau de l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes dans des fioles bien fermées et cela, afin d'éviter toute forme de contamination provenant des plantes. L'extrait est récupéré par filtration sur papier Wattman stérile sous hotte aspirante. Le filtrat obtenu a été récupéré dans des flacons en verres stériles hermétiquement fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation aux concentrations 50 % et 100% pour la solution mère de romarin **[125 ; 126].**

Deux concentrations (100% et 50%) de l'extrait aqueux de romarin ont été retenues pour cette étude et correspondent respectivement aux doses D1 = 100% et D2 50%.

Une quantité suffisante des extraits de romarin ainsi que leurs dilutions a été ajoutée aux flacons contenant les milieux PDA et levane suivie par une légère agitation pour homogénéiser le milieu de façon à obtenir dans chaque boite de pétri 20ml de milieu et 5 ml d'extrait. En ce qui concerne les témoins, l'extrait a été remplacé par l'eau distillée stérile. Chaque dilution a été répétée trois fois pour chaque isolat phytopathogènes.

II.3.2.2- Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* :

La méthode d'extraction la plus utilisée pour les huiles essentielles est l'hydro distillation, car c'est une méthode qui est très simple d'une part. D'autre part, parce que l'eau est un bon solvant qui capte les produits les plus subtiles et les plus fragiles élaborés par le végétal et sans altérer leur qualité et leur composition chimique en maîtrisant la température et la pression pendant le procédé **[127].**

L'extraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* a été effectuée en utilisant un appareil de type Clevenger **(annexe 2).**

a) Mode opératoire :

Nous avons placé, dans un ballon de 2 litres, 600 ml d'eau déminéralisée et 150 à 200 g du romarin. Nous avons mis en fonction le réfrigérant en réglant le débit d'eau et le contenu du ballon à chauffer (ébullition douce) pendant 3 à 4 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversant le réfrigérant sont condensées et chutées dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se sont séparées par différence de densité. Les huiles essentielles sont récupérées dans de petits flacons en verre, opaques fermés hermétiquement pour les préserver de l'air et de la lumière, et conservées à 4°C. Cependant l'hydro distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques **[128].**

b) Calcul du rendement :

Selon la norme **[129],** le rendement en huile essentielle (Rd), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et La masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivant :

$$\mathbf{Rd} = \frac{M'}{M} \mathbf{X100}$$

Rd : Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%) ;

M': Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g) ;

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

c) Préparation des dilutions d'huile essentielle :

L'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* n'est pas miscible à l'eau, elle flotte au-dessus du bouillon de culture et le contact avec les bactéries n'est pas bon. Pour remédier à cela, nous avons utilisé un émulsifiant : le Tween 80. Les huiles essentielles ont été diluées en série allant de C1 = 100%, C2 = 75%, C3 = 50% et C4 = 25% dans le tween 80 **[130 ; 131].**

II.3.3- Activité *in vitro* de l'extrait aqueux de romarin sur l'isolat de champignon :

II.3.3.1- Etude du pouvoir antifongique *in vitro* de l'extrait aqueux du romarin :

Le pouvoir antifongique *in vitro* a été basé sur l'inhibition de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la germination des deux isolats de *Fusarium*.

II.3.3.1.1- Inhibition de la croissance mycélienne :

L'inhibition de la croissance mycélienne a été basée sur la méthode de contact direct, décrite par **[132].** Ainsi, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre de chaque isolat a été prélevé séparément puis déposé au centre des boites de pétri. L'incubation des boites ainsi préparées se fait dans l'étuve réglée à la température de 25°C pour évaluer la croissance mycélienne. Après une durée d'incubation de 04 jours, en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boites de culture.

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminé pour chaque isolat de *Fusarium* selon la formule décrite par **[133 ; 134].**

$$\mathbf{I\%} = \frac{(\boldsymbol{DT - DPA})}{\boldsymbol{DT}} \mathbf{X100}$$

IC : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

DT : croissance mycélienne de l'agent phytopathogènes témoin (mm).

DPA : croissance mycélienne de l'agent phytopathogènes traité (mm).

II.3.3.1.2- Inhibition de la sporulation et de la germination :

Les taux d'inhibition de la sporulation ont été déterminés après une période d'incubation de 08 jours de croissance des isolats de *Fusarium* en contact directe. Ce qui consiste à verser 10 ml d'eau distillée stérile dans chaque boite de culture d'isolat de *Fusarium* puis, racler cette dernière à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour récupérer les

suspensions des conidies dans des tubes à essai stérilisés. Ces derniers ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex (**Annexe 2)**. Les suspensions des conidies de chaque isolat phytopathogènes issues de la confrontation directe, ainsi que celles des isolats témoins ont fait l'objet de détermination de la concentration en conidies par le biais d'une cellule de Malassez sous microscope optique. Ainsi, les taux d'inhibition de la sporulation ont été déterminés pour chaque isolat de *Fusarium* selon la formule décrite par **[135 ; 136].**

$$\textbf{IS (\%)} = \frac{(ST - St)}{ST} \textbf{X100}$$

IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.

ST : Concentration en sporanges de l'inoculum témoin (nombre des conidies /ml).

St : Concentration en sporanges de l'inoculum traité (nombre des conidies /ml).

D'autre part, la détermination des taux d'inhibition de la germination repose sur la préparation de suspensions des conidies de l'ordre de 10^5 conidies/ml pour chaque isolat de *Fusarium*.

La germination IG a été déterminée pour les deux isolats de *Fusarium* à raison de trois répétitions pour chaque isolat, en utilisant la formule décrite par **[137]** :

$$\textbf{IG (\%)} = \frac{(NT - NPA)}{NT} \textbf{ X 100}$$

IG : Taux d'inhibition de la germination en %.

NT : Concentration en sporanges germés de l'inoculum témoin (nombre de spore germés/ml).

NPA : Concentration en sporanges germés de l'inoculum traité (nombre de spore germés/ml).

II.3.3.1.3- Analyses statistiques :

L'analyse statistique (tableaux, histogrammes) des donnés traité par un logiciel Excel stat 2007 pour la détermination de la signification des résultats.

II.3.4- Activité *in vitro* de l'extrait aqueux de romarin sur l'isolat de bactérie :

II.3.4.1- Méthode de contact directe :

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, la crème bactérienne a été ensemencée par des stries dans des boites contenant le milieu Levane ainsi que les extraits comme décrit préalablement.

L'incubation des boites ainsi préparées se fait dans l'étuve réglée à la température de 27°C pour évaluer le développement bactérien pendant 72 heures.

II.3.4.2- Méthode de dilution :

La gamme de concentration de l'extrait aqueux du romarin a été préparée dans sept tubes à essais par la méthode de dilution selon une progression géométrique de raison 10^{-1} à 10^{-7}, plus le témoin et la pure.

Dans une série de tubes, a été introduite 1ml de l'inoculum bactérien pur. Ensuite, ces tubes ont été incubés à 27 °C pendant 24 h.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 24 h.

Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu. **[138].**

II.3.5-Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis* :

a) Méthode de diffusion en milieu gélosé

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatogramme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques **[139].**

b) Principe

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et champignons). Soumis au contact de l'huile essentielle et ceci par méthode de diffusion en milieu gélosé. Ce test est effectué par dépôt des disques en papier buvard stériles de 6mm imprégnés d'une quantité de 25 µl de l'huile essentielle sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par étalement pour les bactérie et repiquage pour les champignons [**140].**

c) Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman N3 de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 20minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

d) Préparation de l'inoculum :

A partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries, en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 1ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes.

e) Ensemencement et repiquage des boites de Pétri :

On a pris 100 µl de la suspension d'*E. amylovora* puis on étale par le rato sur une boite de Pétri stérile contenants le milieu levane, repiquages de *Fusarium* sp par transplantation successive des disques mycéliens de chaque isolat dans des boites de Pétrie contenants le milieu PDA.

f) Dépôt de disques :

Les disques absorbants stériles d'environ 6mm de diamètre sont imprégnés d'huile essentielle puis déposés à l'aide d'une pince stérile à raison de 3 disques par boite de Pétri (figure 12). Le témoin correspond aux disques imprégnés par le tween 80 à 30%.

Les trois disques/boite correspondent à des répétitions. Les boites de Pétri sont ensuite fermées par parafilme pour les souches de *Fusarium* sp et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes et mises à l'étuve à température de 27 – 28°C pendant 24 à 48 heures pour les bactéries, et 27 à 28°C pendant une semaine pour les champignons.

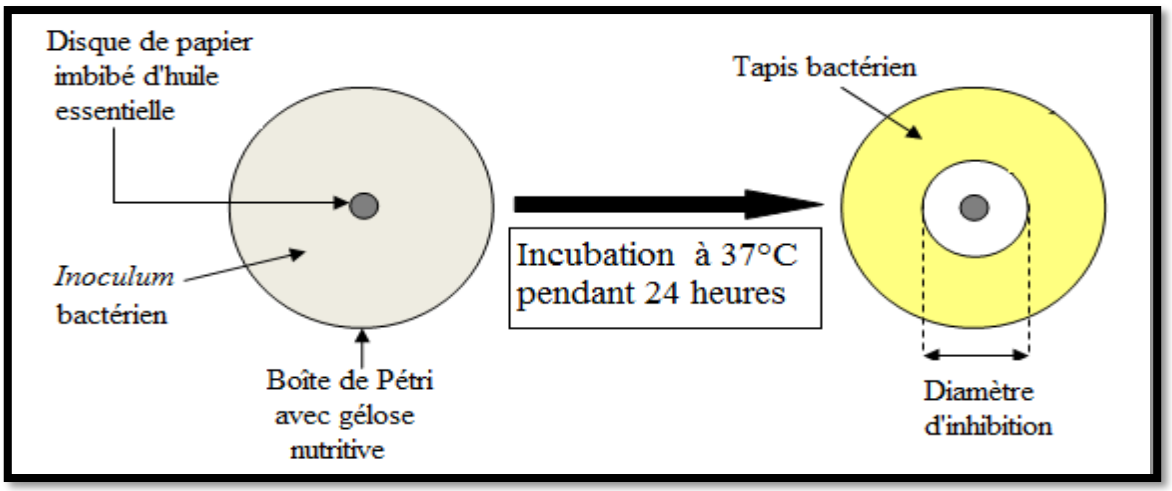


Figure 13 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

g) Lecture :

- La lecture de l'activité antifongique de l'HE est évaluée par rapport à la croissance radiale exprimée en pourcentage d'inhibition du mycélium par des composés volatiles, en utilisant la formule décrite par **[119].** :

$$\mathbf{PI} = \frac{\boldsymbol{DC - DT}}{\boldsymbol{DC}} \mathbf{X\ 100}$$

PI : pourcentage d'inhibition.

Dc : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité en mm.

Dt : le diamètre moyen de la croissance mycélienne.

- La lecture de l'activité antibactérienne se fait par la mesure du diamètre de la zone

D'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis à vis des huiles essentielles. **[141].**

Le diamètre des zones d'inhibition (ZI), nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés par l'HE, pour classer les germes nous avons utilisé les normes (Tableau2) établies par **[141].**

Le classement des bactéries et des champignons se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix (tableau 2).

Tableau 1 : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités **[141].**

Diamètre de la zone d'inhibition	Le dégrée de la résistance
D<5mm	Souche résistante (-).
6mm ≤ D≤ 11mm	Souche sensible (+).
12mm ≤ D≤ 16mm	Souche très sensible (++).
D>17 mm	Souche extrêmement sensible (+++).

II.3.5.2-Analyse statistique

Pour faire les analyses statistiques, nous avons utilisé le logiciel [XL STAT (2013) et Statistica (ver. 06)]. Basée sur le test de Tukey(HSD).

III.1-Résultats

III.1.1-Description morphologique des souches de *Fusarium* sp :

D'après les observations macroscopiques de la souche de *Fusarium* de blé dur, nous avons enregistré les caractères suivants : couleur jaune pâle, Filamenteux, laineux (Tableau 3 et Figure13). Alors que pour la souche d'agrume, les observations macroscopiques, ont révélé la présence des caractères suivants : couleur rose, circulaire, laineux

Tableau 2 : Les caractères macroscopiques des souches de *Fusarium* sp.

	Couleur	**Forme**	**Texture**
***Fusarium* B**	Jaune pale	Filamenteux	Laineux
***Fusarium* A**	Rose	Circulaire	Laineux

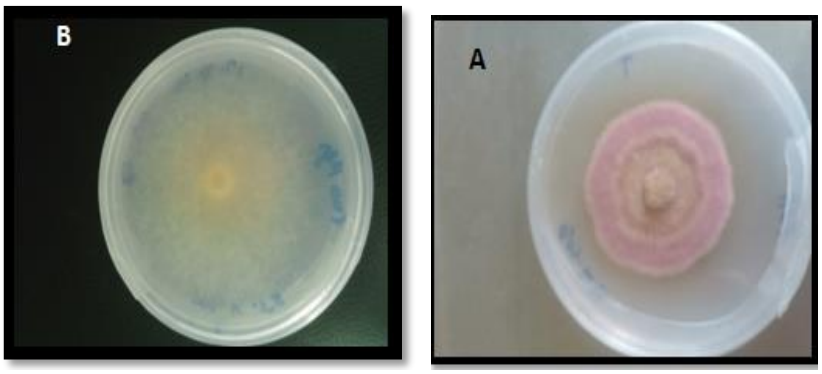


Figure14 : Résultat d'isolement, (B) souche blé dur, (A) souche d'agrumes.

III.1.2. 1- Isolement et obtention des isolats d'*Erwinia amylovora* :

Après le prélèvement des échantillons, nous avons isolé les bactéries à partir des endroits différents : Feuille, les jeunes rameaux.

Les colonies présentant les caractéristiques recherchées ont été sélectionnées et de ce fait, nous avons pu collecter des colonies pures à partir de milieu levane.

III.1.2. 2-Description morphologique des colonies d'*Erwinia amylovora* :

D'après les observations macroscopiques, les colonies typiques ont les caractères décrits ci-après.

- **Sur levane :** les colonies apparaissent après 48 heures, crème circulaires bombées ; lisses et muqueuses, brillantes avec un halo de couleur plus foncée à la périphérie de la colonie (Figure 14A).

- **Sur KB :** les colonies apparaissent après 48 heures de couleur crème, circulaires tendant à s'étaler et, non-fluorescentes (sous UV à 365 nm). (Figure 14B)

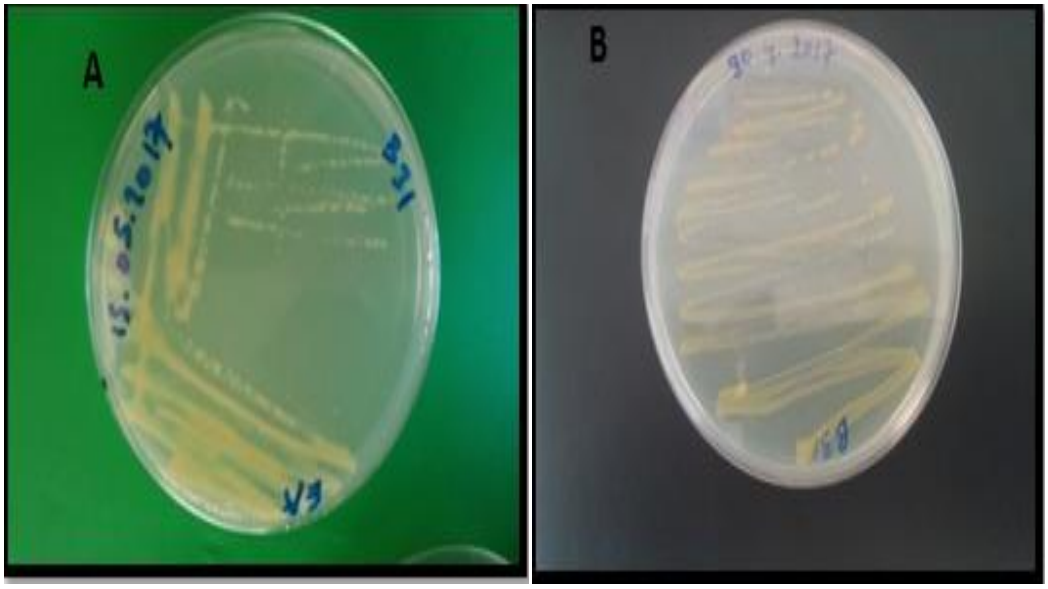


Figure 15 : aspects des Colonies d'*Erwinia amylovora*,
sur milieu levane (A), sur milieu KB (B),

III.1.2.3-Identification d'*Erwinia amylovora*:

III.1 .2.3.1-Tests Biochimiques:

- **Test à la potasse indicatrice du GRAM :**

Les bactéries à Gram négatif provoquent une augmentation de la viscosité du KOH et forme un filament mucoïde lorsqu'il est relevé à partir de la lame. Ce procédé utilise la destruction rapide de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatif dans une solution alcaline, libérant l'acide désoxyribonucléique, ce qui provoque la viscosité de la solution. (Figure15)

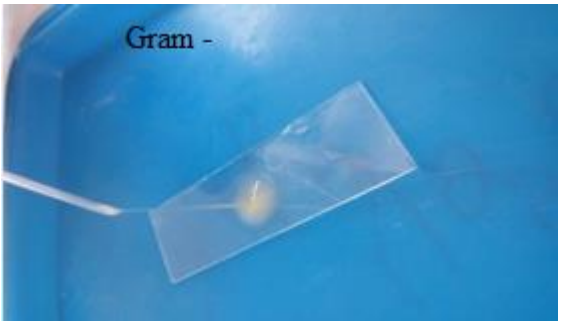


Figure16 : Résultat test de Potasse (KOH) 3%.

- **Test de coloration de Gram :**

L'observation des bactéries sous microscope optique donne des résultats de coloration de Gram négative, les bactéries apparaissent de couleur rose et en forme de bâtonnet confirmant ainsi l'identification**.** (Figure16).

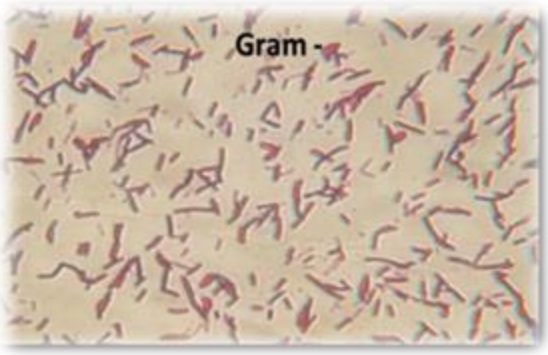


Figure 17 : Résultat du test coloration de Gram- .

- **Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase :**

Concernant les résultats du test de production de cytochrome oxydase par nos bactéries, ils se sont révélés négatives (absence de coloration) (Figure17)



Figure 18 : Résultat de l'activité cytochrome oxydase.

- **Test catalase :**

La présence de bulles(Effervescence) révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive, donc L'enzyme catalase est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène, (Figure 18)

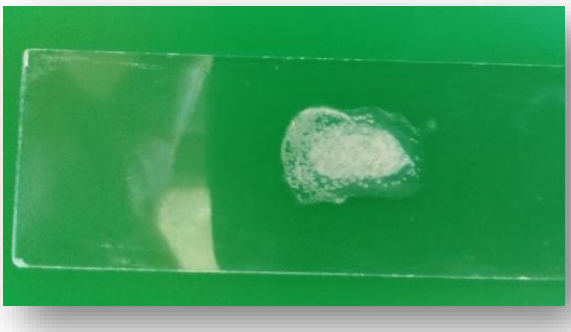


Figure 19 : Résultat du test catalase.

- **Test de fluorescence sur KB :**

Les résultats de cette expérience nous ont indiqué que nos bactéries n'ont pas données des fluorescences allant du vert au bleu sous lumière UV. Le test de fluorescence sur milieu King B est négatif pour l'ensemble des isolats. (Figure19).



Figure 20 : Observation de fluorescence sur King B.

- **Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose :**

Les résultats du test de mise en évidence du métabolisme oxydatif et fermentatif montrent que les tubes testés, des différents isolats, soumis aux conditions d'aérobioses et d'anaérobioses changent tous leurs couleurs vers le jaune. Ceci prouve que les tests sont tous positifs et que nos bactéries sont toutes fermentatives. La souche testée révéle qui sont de bactérie anaérobie facultative. (Figure 20)

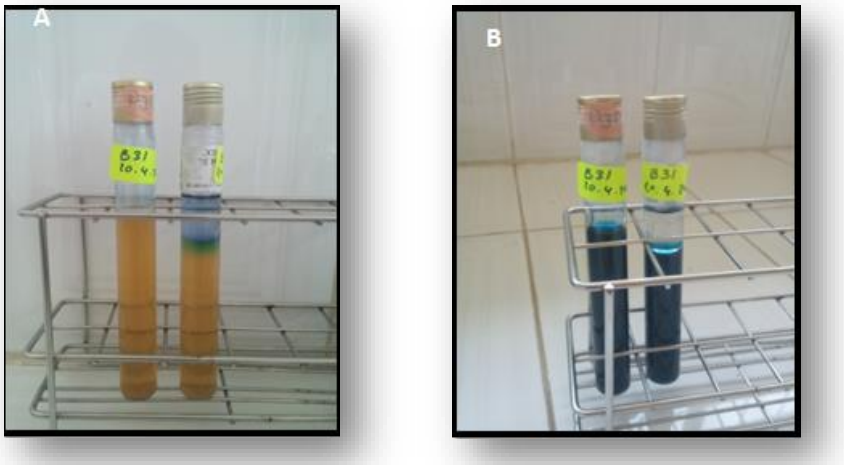


Figure 21 : Résultat de métabolisme du glucose, A) après l'ensemencement, B) avant l'ensemencement (témoins).

- **Production d'Indole par les bactéries :**

Concernant les résultats du test de production d'indole par nos bactéries ; ils se sont révélés négatifs, les bactéries isolées n'ont pas synthétisé l'enzyme tryptophanase qui dégrade l'acide aminé Tryptophane**.** Ces résultats concordent avec notre diagnostic du fait que la souche

d'*Erwinia amylovora* ne dégradent pas le Tryptophane et ne produisent pas d'anneau rouge après addition du réactif de Kovac**.** (Figure21).



Figure 22 : Résultat de production d'indole par les bactéries.

- **Croissance à 39°C :**

L'absence de croissance des colonies, manifestées à une température de 39°C pendant trois jours indique également un caractère physiologique d'*Erwinia amylovora*. En effet, cette bactérie ne présente aucun pouvoir de croissance au-delà de 39°C mais une fois qu'elle revient sur sa température optimale elle croit normalement. D'une manière générale, *E. amylovora* se conserve en conditions défavorables mais dès que les conditions redeviennent favorables elle se développe normalement et infecte les tissus végétaux**.** (Figure22).

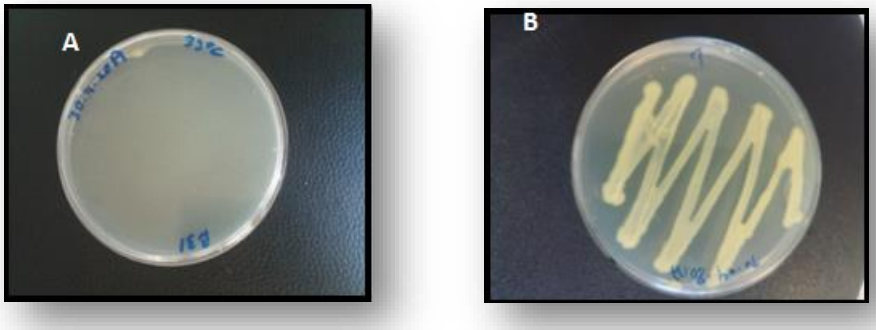


Figure 23 : Test de croissance à 39° (A), et (B) croissance sur température ambiant.

- **Test d'arginine Dihydrolase :**

Une réaction positive indique qu'il y a eu transformation de l'arginine par l'enzyme arginine dihydrolase. (Figure 23).



Figure 24 : Résultat positive de l'arginine dihydrolase.

- **Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase :**

Après ensemencement en strie des boites de Pétri contenant le milieu levane et incubation pendant 48 à 72 heures à 27 °C, les bactéries développent des colonies abondantes, bombées, blanches, brillantes et très muqueuses (Figure24). Ces aspects indiquent la présence d'une activité levane sucrase causé par une enzyme du même nom qui catalyse le saccharose sur une chaîne de fructoses servant à la biosynthèse des levane**.**



Figure 25 : Résultat de développement de bactérie sur milieu levane.

III.1.2.3.2-Test biologique :

- **Test d'hypersensibilité sur tabac :**

Le test biologique a été réalisé sur les isolats à Gram négatif et après 72 et 120 heures d'inoculation des nécroses ont été observés (Figure25). Donc les isolats à Gram négatif sont phytopathogènes. *Erwinia amylovora* induit une réaction d'hypersensibilité (RH) chez les plantes non hôtes ou résistantes comme le tabac. La RH est une réaction rapide de défense de la plante induisant la mort programmée des cellules et la production de divers agents antimicrobiens bloquant ainsi la progression du pathogène. Le test RH a été effectué sur des feuilles de tabac.

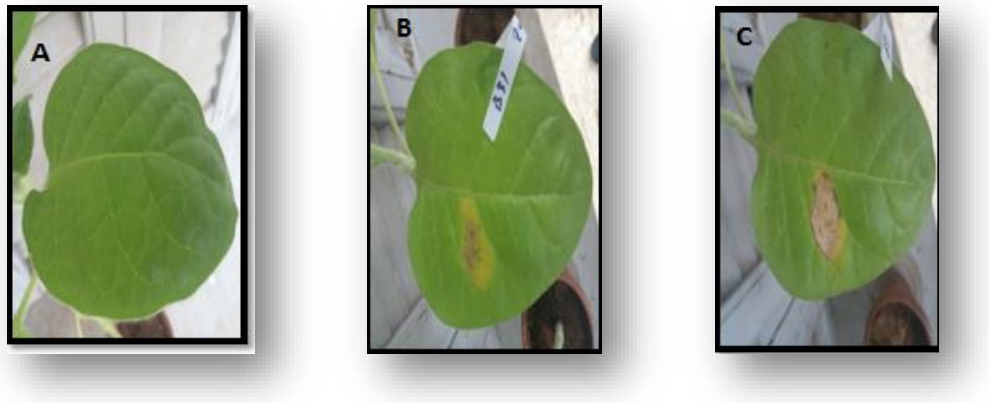


Figure 26 : Résultat d'hypersensibilité sur tabac, A) Témoin négatif inoculée à l'eau distillée stérile, B) après 72 h d'inoculation, C) après 5 jours d'inoculation.

III.1.2.3.3-Test sérologique :

A. Test de l'immunofluorescence :

- Témoin positif : Les cellules doivent être fluorescentes brillantes et la paroi cellulaire doit être complètement colorée, et le nombre de bactérie moins condensé que la solution mère.

- Souche de référence : l'observation par microscope à épi fluorescence détermine la présence d'*Erwinia amylovora* sous forme de bâtonnets fluorescent ce qui confirme que la bactérie n'est pas contaminée.

- Témoins négative : pas de bactérie.

- Solution mère : la présence des bactéries à condensation élevée fluorescente et d'aspect bâtonnets.

- Les dilutions 1/10 et 1 /100 : la forme de bactérie devient plus visible et fluorescente que la solution mère.

Donc le résultat du lecteur de la lame IF au microscope à épi fluorescence se traduisant à la présence de cellules fluorescentes dont la taille et la morphologie sont typique à *Erwinia amylovora*.

Le tableau 4 ci-dessous récapitule les résultats des différents tests d'identification :

Tableau 3 : Les résultats des tests d'indentification.

Les tests d'indentification		**Résultat**
Teste biochimique	**Test à la potasse indicatrice du GRAM**	**-**
	Test coloration de Gram	**Bâtonnet rose**
	Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase	**-**
	Test catalase	**+**
	Test de fluorescence sur KB	**-**
	Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose	**Fermentative**
	Production d'Indole par les bactéries	**-**
	Croissance à 39°C	**-**
	Test d'arginine Dihydrolase	**+**
	test de mise en évidence de l'activité levane sucrase	**+**
Teste biologique	**Test d'hypersensibilité sur tabac**	**+**
Teste sérologique	**Test de l'immunofluorescence**	**+**

III.1.4- Etude de l'effet *in vitro* de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes :

III.1.4.1- Etude de l'effet *in vitro* de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes :

- **Etude macroscopique des isolats :**

Nous avons remarqué que la croissance mycélienne de *Fusarium* sp de blé et des agrumes, apparait bien développée à la dose D1 de 100% pour les deux souches, moins développé pour la dose D2 de 50% et faible pour le témoin. (Figure 26 A et B).

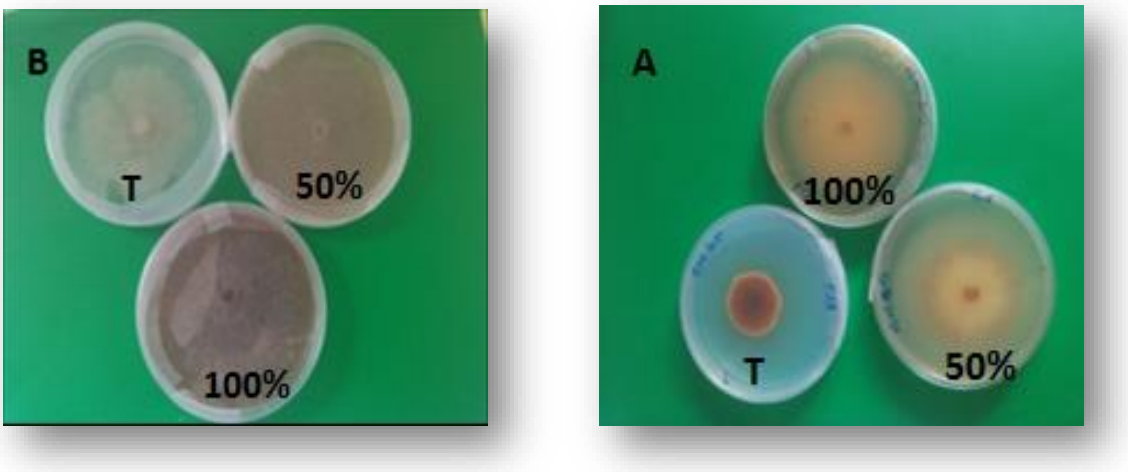


Figure 27 : développement de *Fusarium* de blé (B) et d'agrumes (A) sur l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*.

- **Croissance mycélienne :**

La figure 27 montre l'activité antifongique des deux doses (D1 = 100% et D2 = 50%) de l'extrait aqueux de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques. Les résultats révèlent que la croissance mycélienne augmente avec l'augmentation de la dose d'extrait aqueux. Pour le *Fusarium* de blé, la croissance mycélienne est de 3,1 cm chez les témoins et de 4,24 cm et 4,26 cm respectivement pour D2 et D1, alors que chez la souche des agrumes, elle est de 4 cm chez les témoins et de 6,18 cm pour D2 et 6,28 cm pour D1.

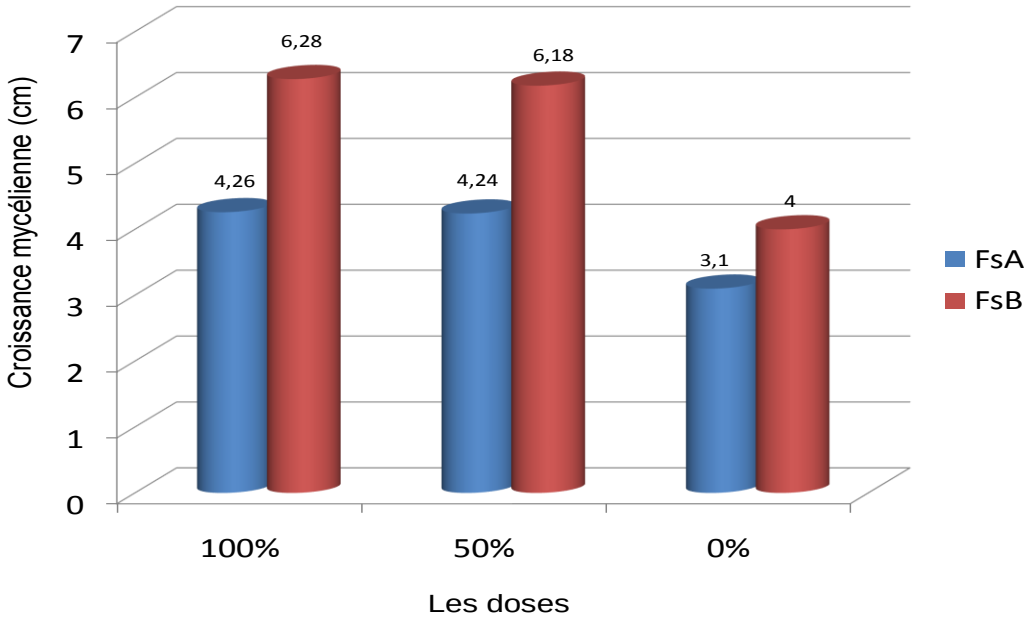


Figure 28 : Effet des deux doses d'extrait aqueux de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne des souches de *Fusarium* sp

- **Taux d'inhibition de la croissance mycélienne :**

Après le calcul du taux d'inhibition de la croissance mycélienne pour les deux doses (D1 = 100% et D2 = 50%), les résultats trouvés sont nuls, donc l'effet de l'extrait aqueux de *R. officinalis* n'est pas inhibiteur.

- **Sporulation**

Les résultats de l'effet des différentes doses d'extraits aqueux sur la sporulation sont présentés dans la figure 28. Pour les deux souches, nous avons constaté que le nombre de spores est en diminution suivant la dose. Chez la souche des agrumes, le nombre de spores passent de 38 à 30 puis 26 respectivement chez les Témoins, D2 et D1. Alors que pour la souche de blé, le nombre diminue de 24 chez les témoins vers 21 à 19 chez D2 et D1 respectivement.

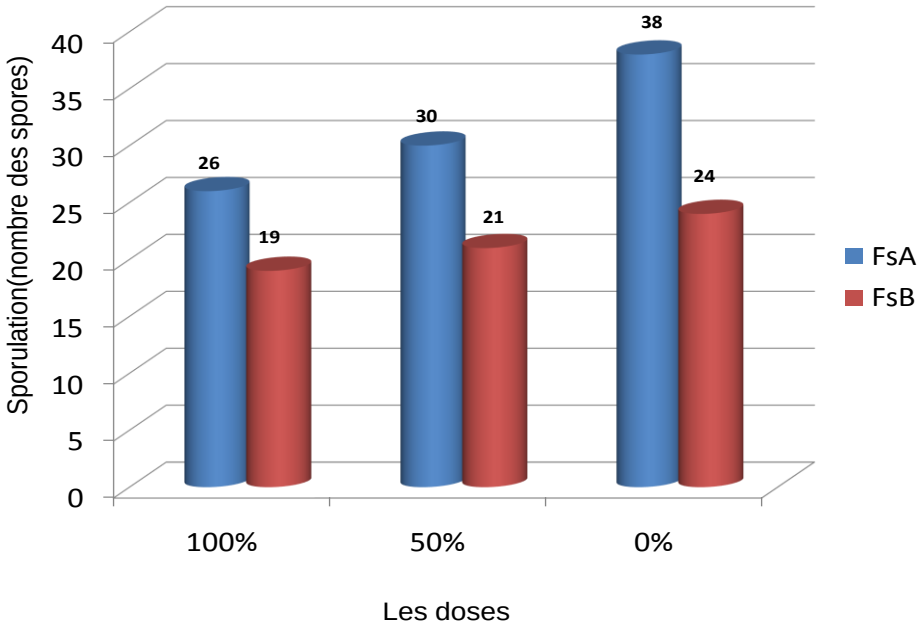


Figure 29 : Sporulation de *Fusarium* sp sous l'effet d'extraits de *Rosmarinus officinalis.*

➢ **Taux d'inhibition de sporulation :**

Après le calcule de taux d'inhibition de sporulation IS (%) des doses D1 : 100% et D2 : 50%, Nous constatons que le taux d'inhibition de sporulation diminue en fonction de la dose. Pour D1, nous avons un taux d'inhibition de sporulation égale à 31 ,57% chez la souche d'agrumes et de 20,83% chez la souche de blé, ainsi que pour D2 le taux d'inhibition de sporulation égale à 21,05% chez l'agrumes et 12,5% chez la souche de blé.

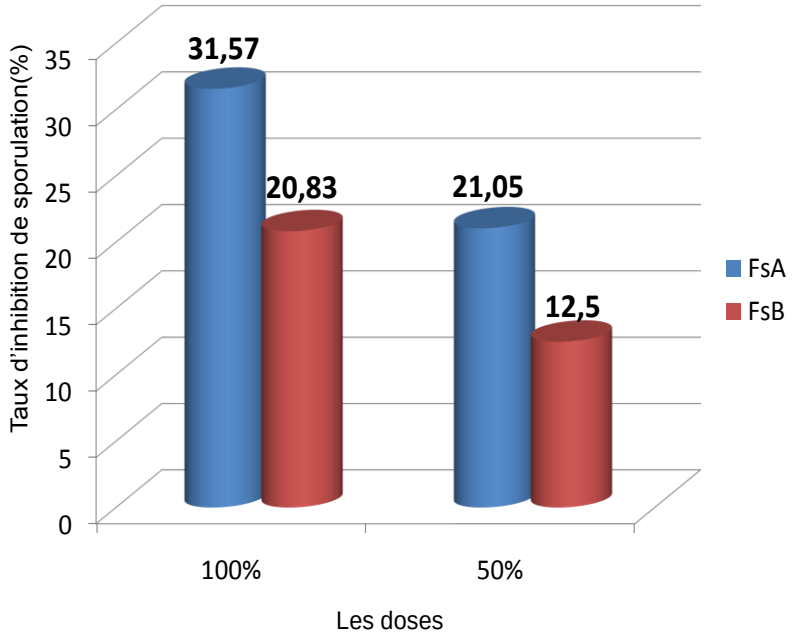


Figure 30 : Effet d'extrait aqueux sur le taux d'inhibition de sporulation de *Fusarium* sp

- **Germination**

Après l'observation microscopique, nous avons remarqué qu'aucune spore n'a été germée.

III.1.4.2- Evaluation de l'activité d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes :

III.1.4 .2.1-Rendement en huile essentielle et caractères organoleptiques :

D'après le tableau 5, nous remarquons que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* obtenue par hydrodistillation a une forte odeur camphrée, d'une couleur jaune clair et d'un aspect liquide mobile. L'huile essentielle de romarin possède un rendement important avec un pourcentage de 1,25% comparativement avec les normes d'AFNOR.

Tableau 4 : Rendement et caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis.*

	Aspect	**Couleur**	**Odeur**	**Rendement %**
L'AFNOR	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à Jaune pâle	Caractéristique fraîche, Plus ou moins camphrée selon l'origine	(0,5-2%)
Huile essentielle	Liquide mobile	Jaune clair	Camphrée	1,25%

III.1.4.2.2- Evaluation de l'activité d'huile essentielle de *R. officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes :

L'étude de l'activité antifongique par la méthode d'aromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été évaluée sur les deux souches fongiques.

Les résultats du test de sensibilité de deux champignons aux huiles essentielles sont récapitulés dans le tableau 6. Les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 mesures.

D'après le tableau 6, on remarque qu'il y a une forte inhibition de la croissance radiale des deux isolats fongiques par l'huile essentielle. Il est a noté que l'activité antifongique la plus élevée a été enregistrée chez *Fusarium* sp de blé, elle passe de 30.30% pour la faible concentration (C4 = 25%) vers 57.92% pour la forte concentration (C1 = 100%), alors que pour la souche des agrumes, nous avons constaté que la concentration est moins importante par rapport à la 1ère souche, elle passe de 19.44% pour la faible concentration (C4 = 25%) vers 55.92% pour la forte concentration (C1 = 100%) avec une valeur de 57,92% pour (C1= 100%). Donc l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a un effet inhibiteur sur les

deux champignons testés, ce qui confirme l'efficacité antifongique de l'HE vis-à-vis de ces champignons phytopatogènes.

Tableau 5 : Résultats de l'activité antifongique d'HE de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* de blé et des agrumes.

Champignon phytopatogènes	**Concentrations**	**Pourcentage d'inhibition**	**Sensibilité**
***Fusarium* de blé**	C1 (100%)	57,92%	+++
	C2 (75%	49 ,88%	++
	C3 (50%)	41,37%	++
	C4 (25%)	30,30%	+
***Fusarium* d'agrumes**	C1 (100%)	55,92%	+++
	C2 (75%	42,03%	++
	C3 (50%)	34,63%	+
	C4 (25%)	19,44%	+

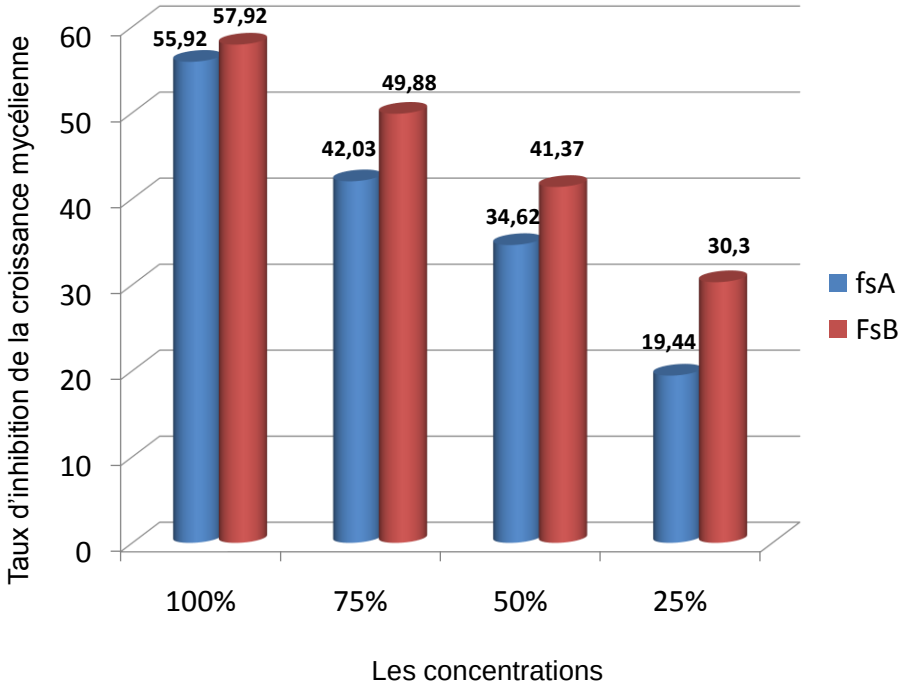


Figure 31 : Effet de la concentration d'huile essentielle de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne de *Fusarium* sp.

On remarque d'après la figure 30, une variation significative d'inhibition de la croissance radiale pour les deux isolats fongiques par différentes concentrations de l'huile essentielle. La

concentration 100% donne le fort effet avec 57.92% pour la souche de blé et 55.92% pour la souche des agrumes,

Pour la concentration 75%, nous avons relevé des taux respectifs de 49,88% (souche blé), 42,03% (souche agrumes) et 41,37% (souche blé), 34,62% (souche agrumes) pour la concentration de 50% et 30.3% (souche blé),19.44% (souche agrumes) pour la concentration de 25%.

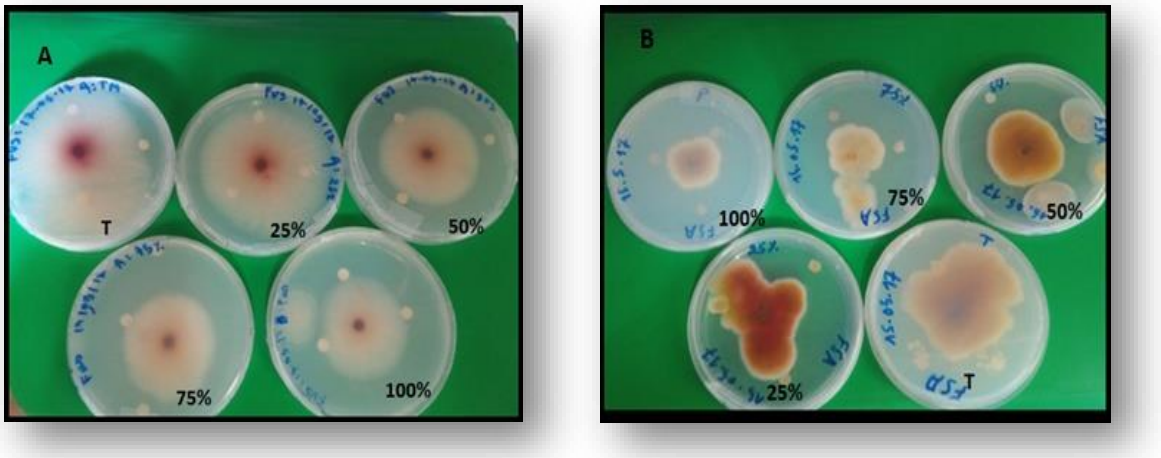


Figure 32 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur la croissance mycélienne des 2 souches de blé (A) et des agrumes (B).

III.1.4.2.3- Analyse statistique :

- **Analyse de la variance (ANOVA)**

L'analyse de la variance basée sur le test de Tukey (HSD) réalisée par le logiciel [XL STAT (2013) et Statistica (ver. 06)].

A).1 –Effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp de blé *:*

Le R^2 (coefficient de détermination) donne une idée du pourcentage de variable à modéliser et expliquer par les variables explicatives. Plus ce coefficient est proche de 1, meilleur est le modèle. Dans notre cas, 87.9 % de la variabilité est expliquée par les concentrations. Le reste de la variabilité est explicable par des effets qui ne sont ni recensés, ni mesurés dans cette analyse (tableau 7).

Tableau 6 : Coefficients d'ajustement (huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp de blé)

R (coefficient de corrélation)	0,938
R^2 (coefficient de détermination)	0,879
R^2aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,859
SCR (somme des carrées résiduels)	11,727

Nous avons remarqué que l'intervalle de confiance pour l'effet des concentrations C4 et C2, C4 et C3 comprend la valeur 0, ce qui indique que C2 et C3 ne sont pas significativement différent de C4, et l'intervalle de confiance pour l'effet des concentrations C3et C2, C2et C1 comprend la valeur 0, ce qui indique que C2 n'est pas significativement différente de C3. Et indique que C1 n'est pas significativement différente de C2. Pour T et C4 la différence est significative (tableau 9).

Tableau 7 : Paramètre du modèle (huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp de blé)

Paramètre	Valeur	Ecart-type	T de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	3,640	0,313	11,644	< 0,0001	2,995	4,285
C1-C1	0,000	-	-	-	-	-
C1-C2	0,660	0,423	1,559	0,132	-0,214	1,534
C1-C3	1,393	0,423	3,292	0,003	0,520	2,267
C1-C4	1,393	0,423	3,292	0,003	0,520	2,267
C1-T	4,943	0,423	11,679	< 0,0001	4,070	5,817

A).2- Test de comparaison multiple pour la variable (Concentration) : Le teste de Tukey (HSD) va nous permettre de répondre à notre question initiale : y va-t-il une différence significative entre les concentrations si oui, comment peut-on les classer ? Le test de Tukey (HSD) est appliqué à l'ensemble des couples de différence possible (comparaison des moyennes deux à deux) montre aucune différence non significative (tanleau10).

Tableau 8 : Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % (huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp de blé).

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. >Diff	Significatif
T ~ C1	4,943	11,679	2,946	< 0,0001	Oui
T ~ C2	4,283	10,613	2,946	< 0,0001	Oui
T ~ C3	3,550	8,796	2,946	< 0,0001	Oui
T ~ C4	3,550	8,796	2,946	< 0,0001	Oui
C4 ~ C1	1,393	3,292	2,946	0,023	Oui
C4 ~ C2	0,733	1,817	2,946	0,387	Non
C4 ~ C3	0,000	0,000	2,946	1,000	Non
C3 ~ C1	1,393	3,292	2,946	0,023	Oui
C3 ~ C2	0,733	1,817	2,946	0,387	Non
C2 ~ C1	0,660	1,559	2,946	0,536	Non

Valeur critique du d de Tukey : 4,166

Le classement des groupes différents fait apparaître que le témoin et les concentrations C4, C3 et C2 forment deux groupes différents en A et B respectivement. Par contre C2 et C1 forment deux groupes homogènes en B et C respectivement. Et la concentration C2 le regroupement de B plus proche en A (tableau11).

Tableau 9 : Classement des groupes homogènes des moyennes de la croissance mycélienne de la souche de blé par l'huile essentielle de *R.officinalis* par rapport aux différentes concentrations.

Modalités	Moyenne	Regroupements		
T	8,583	A		
C4	5,033		B	
C3	5,033		B	
C2	4,300		B	C
C1	3,640			C

B).1 –Effet de l'huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp d'agrumes :

Le R^2 (coefficient de détermination) donne une idée du pourcentage de variable à modéliser et expliquer par les variables explicatives. Plus ce coefficient est proche de 1, meilleur est le modèle. Dans notre cas, 92.7 % de la variabilité est expliquée par les concentrations. Le reste de la variabilité est explicable par des effets qui ne sont ni recensés, ni mesurés dans cette analyse (tableau12).

Tableau 10 : Coefficients d'ajustement (huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp d'agrumes)

R (coefficient de corrélation)	0,963
R^2 (coefficient de détermination)	0,927
R^2aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,915
SCR (somme des carrées résiduels)	2,414

Nous avons remarqué que l'intervalle de confiance pour l'effet des concentrations C3 et C2 comprend la valeur 0, ce qui indique que C2 n'est pas significativement différente de C3. Pour T, C4, C3, et C2, C1 la différence est significative (tableau14).

Tableau 11 : Paramètre du modèle (huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp d'agrumes)

Paramètre	Valeur	Ecart-type	T de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	2,360	0,142	16,640	< 0,0001	2,067	2,653
C1-C1	0,000	-	-	-	-	-
C1-C2	0,773	0,192	4,027	0,000	0,377	1,170
C1-C3	1,173	0,192	6,110	< 0,0001	0,777	1,570
C1-C4	1,990	0,192	10,363	< 0,0001	1,594	2,386
C1-T	3,040	0,192	15,831	< 0,0001	2,644	3,436

B).2- Test de comparaison multiple pour la variable (concentration) :

Le teste de Tukey (HSD) va nous permettre de répondre à notre question initiale : y a-t-il une différence significative entre les concentrations si oui, comment peut-on les classer ? Le test

de Tukey (HSD) est appliqué à l'ensemble des couples de différence possible (comparaison des moyennes deux à deux) montre aucune différence non significative (tableau15).

Tableau 12 : Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % (huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur *Fusarium* sp d'agrumes):

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. >Diff	Significatif
T ~ C1	3,040	15,831	2,946	< 0,0001	Oui
T ~ C2	2,267	12,380	2,946	< 0,0001	Oui
T ~ C3	1,867	10,195	2,946	< 0,0001	Oui
T ~ C4	1,050	5,735	2,946	< 0,0001	Oui
C4 ~ C1	1,990	10,363	2,946	< 0,0001	Oui
C4 ~ C2	1,217	6,645	2,946	< 0,0001	Oui
C4 ~ C3	0,817	4,460	2,946	0,001	Oui
C3 ~ C1	1,173	6,110	2,946	< 0,0001	Oui
C3 ~ C2	0,400	2,185	2,946	0,219	Non
C2 ~ C1	0,773	4,027	2,946	0,004	Oui

Valeur critique du d de Tukey : 4,166

Le classement des groupes différents fait apparaître que le témoin et les concentrations C4, C3 forment trois groupes différents en A et C respectivement. Par contre C3 et C2 forment un groupe homogène en C. Et les concentrations C2 et C1 forment deux groupes différents en C et D respectivement (tableau16).

Tableau 13 : Classement des groupes homogènes des moyennes de la croissance mycélienne de la souche d'agrumes par l'huile essentielle de *R.officinalis* par rapport aux différentes concentrations.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
T	5,400	A			
C4	4,350		B		
C3	3,533			C	
C2	3,133			C	
C1	2,360				D

III.1.5-Etude de l'effet *in vitro* de l'extrait aqueux de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora* et évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de *R. Officinalis* :

III.1.5. 1-Etude de l'effet *in vitro* de l'extrait aqueux *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora* :

- **Dans un milieu solide :**

- Pour les témoins : après 48h d'incubation à température favorable 27°c nous avons remarqué un développement abondant d'*Erwinia amylovora* dans le milieu levane.

- Pour la dose 1 (100%) : nous avons remarqué un développement élevé d'*Erwinia amylovora* donc l'extrait aqueux brut n'empêche pas la croissance bactérienne.

- Pour la dose 2 (50%) : nous avons remarqué un développement moins élevé par rapport à la solution D1 (figure32).

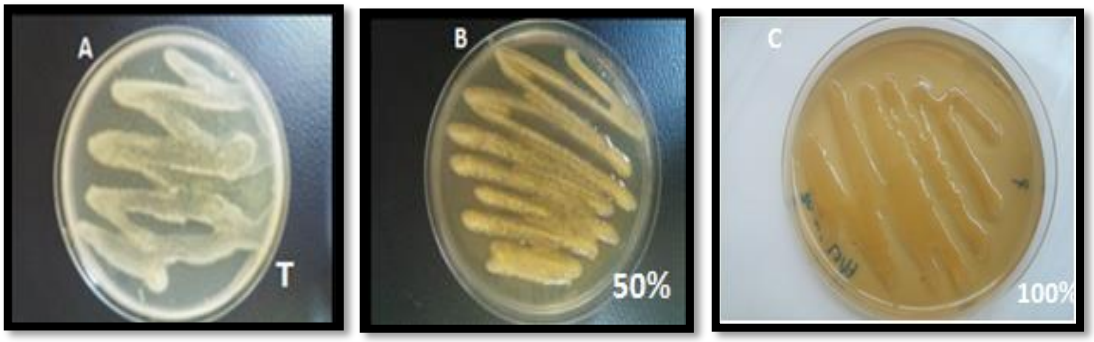


Figure 33 : Comparaison entre le développement des deux doses (B50% et C100%) *d'Erwinia amylovora* sur le milieu levane avec le témoin (A).

- **Dans un milieu liquide :**

- Pour le témoin : nous avons remarqué que le milieu est devenu trouble ce qui traduit le développement *d'Erwinia amylovora*.

- Extrait aqueux brut : nous avons remarqué que le milieu est moins trouble presque transparent.

- Augmentation de dilution (10^{-7} à 10^{-1}) : nous avons remarqué que le milieu est devenu de plus en plus trouble en fonction des dilutions.

Nous constatons que l'extrait aqueux ne possède pas d'effet bactéricide mais un effet bactéristatique. (Figure 33).



Figure 34 : Développement d'*Erwinia amylovora* sur le milieu liquide.

III.1.5.2- Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* d'huile essentielle de *R. Officinalis* sur le développement d'*E. amylovora* :

L'étude *in vitro* de pouvoir antibactérien des HE de *R. officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (levane), après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 27°c, a montré que l'huile essentielle de *R. officinalis* présent un effet positif sur la souche bactérienne étudiées avec des zones d'inhibition de 12,71mm, 10,1mm ; 8,99mm et 7,38 mm respectivement pour les différentes concentrations C1, C2, C3, C4. (Tableau 17)

Tableau 14 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des dilutions pour *Erwinia amylovora*

Dilution	C1 = 100%	C2 = 75%	C3 = 50%	C4 = 25%
zone d'inhibition (mm)	12,71	10,1	8,99	7 ,38
Le dégrée de la résistance	très sensible (++).	sensible (+).	sensible (+).	sensible (+).

L'activité de l'huile essentielle varie d'une concentration à une autre, cette variation peut être observée dans les diamètres des zones d'inhibition qui montre que certaines concentrations sont plus efficaces que d'autres.

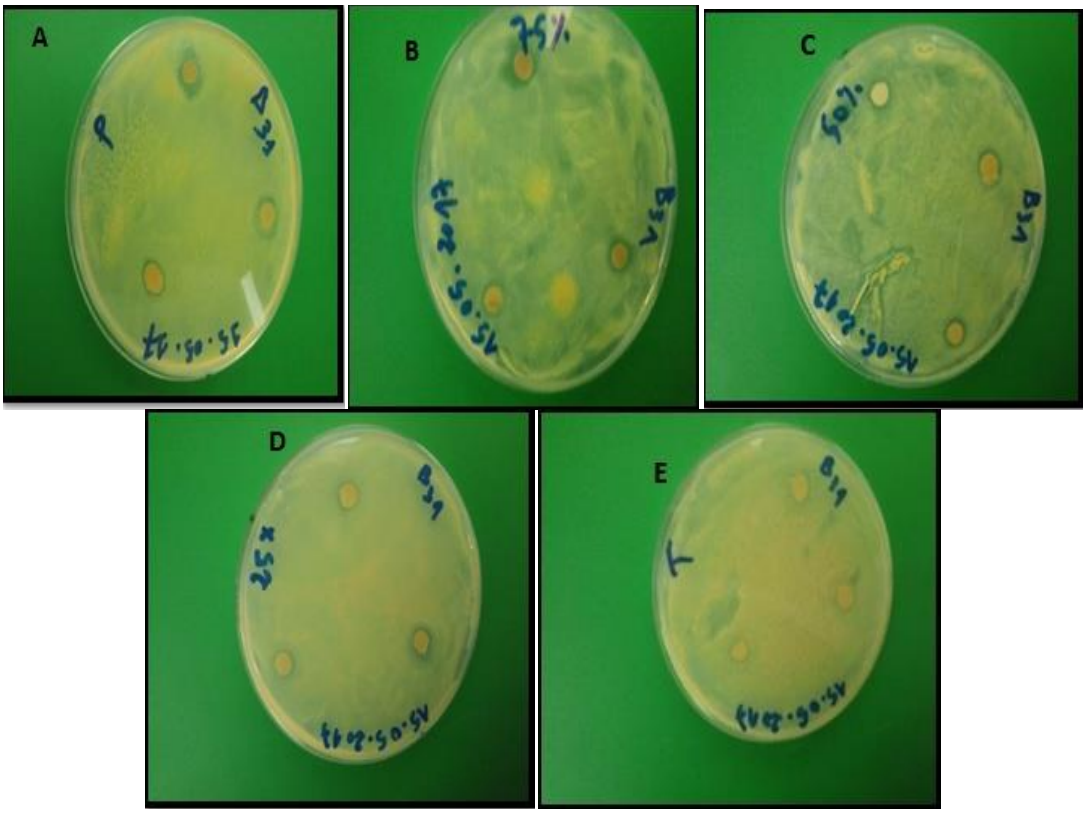


Figure 35 : Effet de déférentes concentrations (A=100%), (B= 75%), (C=50%) et (D=25%), (E=témoin) l'HE de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora*.

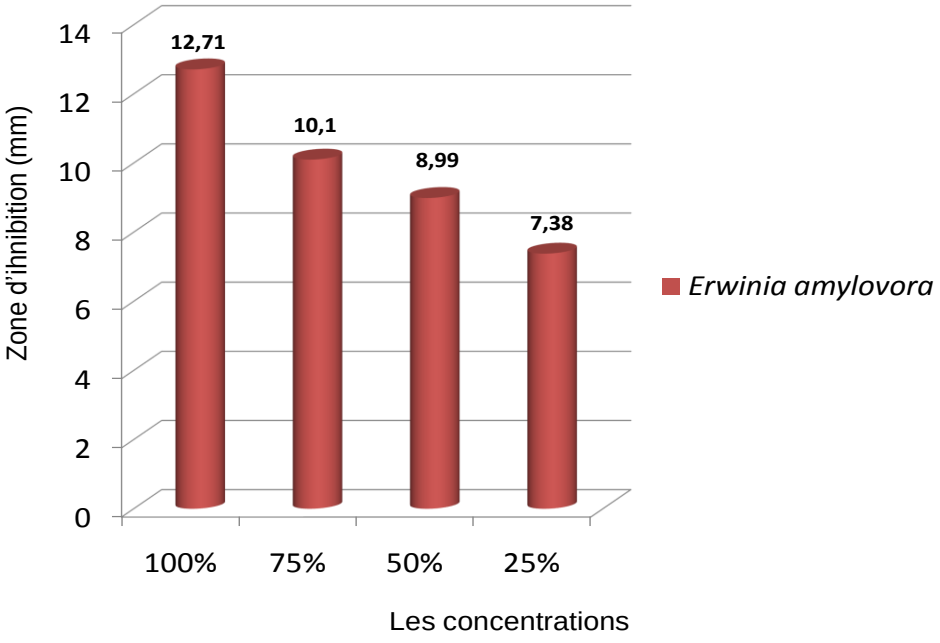


Figure 36 : Zones d'inhibition pour *Erwinia amylovora*.

L'effet de l'huile essentielle de romarin sur *Erwinia amylovora* a donné une zone d'inhibition avec un diamètre de 12,71 mm avec C1 et un diamètre de 10,1 mm avec C2 et un diamètre de 8,99 mm avec C3 et un diamètre de 7,38 mm avec C4, donc on peut constater que *E. amylovora* est sensible pour toutes les concentrations de l'huile essentielle de romarin.

L'étude de l'activité antibactérienne des différentes concentrations de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur cette bactérie montre que toutes les concentrations de cette huile essentielle possèdent une activité antibactérienne surtout pour la concentration pure (100%).

- **La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *R. officinalis* :**

D'après les résultats enregistrés, la bactérie *Erwinia amylovora* ayant présenté une sensibilité vis-à-vis toutes les dilutions de l'huile essentielle. On marque un diamètre d'inhibition qui variée de 12 à 8 mm, la concentration minimale (CMI) obtenue suite à la dilution de l'huile essentielle est de 25%.

III.1.5.2.1- Analyse statistique :

A) Effet de l'huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* sur le développement d'*E. amylovora* :

Le R^2 (coefficient de détermination) donne une idée du pourcentage de variable à modéliser et expliquer par les variables explicatives. Plus ce coefficient est proche de 1, meilleur est le modèle. Dans notre cas, 85,6 % de la variabilité est expliquée par les concentrations. Le reste de la variabilité est explicable par des effets qui ne sont ni recensés, ni mesurés dans cette analyse (tableau 18).

Tableau 15 : Coefficients d'ajustement (huile essentiel de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora*)

R (coefficient de corrélation)	0,925
R^2 (coefficient de détermination)	0,856
R^2aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,850
SCR (somme des carrées résiduels)	79,114

Nous avons remarqué que l'intervalle de confiance pour l'effet des concentrations C1, C2, C3 et C4 la différence est significative. (Tableau 20)

Tableau 16 : Paramètre du modèle (Huile essentiel de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora*)

Paramètre	Valeur	Ecart-type	T de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	12,765	0,235	54,231	< 0,0001	12,297	13,233
42736	0,000	-	-	-	-	-
1-0.75	-2,654	0,328	-8,085	< 0,0001	-3,306	-2,001
1-0.5	-3,765	0,328	-11,470	< 0,0001	-4,417	-3,112
1-0.25	-5,376	0,328	-16,379	< 0,0001	-6,029	-4,723
1-T	-6,765	0,328	-20,610	< 0,0001	-7,417	-6,112

B) Test de comparaison multiple pour la variable (dose)

Le test de Tukey (HSD) va nous permettre de répondre à notre question initiale : y a-t-il une différence significative entre les concentrations si oui, comment peut-on les classer ? Le test de Tukey (HSD) est appliqué à l'ensemble des couples de différence possible (comparaison des moyennes deux à deux) montre aucune différence non significative (tableau 21).

Tableau 17 : Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % (Huile essentielle de *R. officinalis* sur le développement d'*E. amylovora*):

Modalités	**Différence**	**Différence réduite**	**Valeur critique**	**Pr. >Diff**	**Significatif**
T ~ 1	-6,765	-20,610	2,788	< 0,0001	Oui
T ~ 0.75	-4,111	-12,708	2,788	< 0,0001	Oui
T ~ 0.5	-3,000	-9,274	2,788	< 0,0001	Oui
T ~ 0.25	-1,389	-4,293	2,788	0,000	Oui
0.25 ~ 1	-5,376	-16,379	2,788	< 0,0001	Oui
0.25 ~ 0.75	-2,722	-8,415	2,788	< 0,0001	Oui
0.25 ~ 0.5	-1,611	-4,980	2,788	< 0,0001	Oui
0.5 ~ 1	-3,765	-11,470	2,788	< 0,0001	Oui
0.5 ~ 0.75	-1,111	-3,435	2,788	0,008	Oui
0.75 ~ 1	-2,654	-8,085	2,788	< 0,0001	Oui

Valeur critique du d de Tukey : 3,943

D'après le tableau 22, le classement des groupes homogènes fait apparaître que les concentrations C1, C2, C3, C4 et T forment des groupes différents en A à E.

Tableau 18 : Classement des groupes homogènes des moyennes des zones d'inhibition de la croissance d'*E.amylovora* par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par rapport aux différentes concentrations.

Modalités	Moyenne	Regroupements				
T	6,000	A				
0,25	7,389		B			
0,5	9,000			C		
0,75	10,111				D	
1	12,765					E

III.2- Discussion :

III.2.1- Effet d'extrait aqueux de *R. officinalis* sur Fusarium sp de blé et des agrumes :

Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très variées. En plus des métabolites primaires classiques, elles synthétisent et accumulent des métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une large gamme de molécules exploitables en agriculture dans le cadre de la phytoprotection **[142 ; 143].**

Le romarin a fait objet à de nombreux travaux. Ses activités antibactériennes et antifongiques peuvent être résumées par la composition pétrolière de ces extraits **[144 ; 145 ; 146].** Les travaux de **[147].** Ont révélé les composés phénoliques tels que les terpènes où l'on peut citer le borneol, la came-phore, 1,8 cineole, pinene, camphone, verbenonone et l'acétate bornyl.

L'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* par la technique de contact direct consiste à mettre en contact l'extrait aqueux et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers.

Les résultats obtenus dans ce contexte montrent l'absence d'activité inhibitrice de croissance mycélienne de champignon à l'inverse de nombreux travaux rapportés par la bibliographie et ayant déjà confirmé l'efficacité de certains extraits de plantes.

Par ailleurs, d'autres ont rapporté qu'un nombre de composés contenus dans les extraits de romarin possède des propriétés antibactériennes et antifongiques **[148 ; 149].**

Ainsi, l'activité antifongique des extraits de *R. officinalis* L, a été évaluée contre les infections fongiques du blé. Leur effet inhibiteur sur la croissance mycélienne a affirmé que leur utilisation aux concentrations basses pourrait avoir un potentiel significatif pour le contrôle biologique des champignons phytopathogènes tels que *Alternaria alternata, Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* **[150 ; 151].**

D'autre part, **[152].** Ont souligné l'important effet inhibiteur *in vitro* de l'extrait brut et à différentes concentrations de *R. officinalis* à l'égard d'*Alternaria solani.*

Parallèlement, les observations microscopiques des isolats fongiques traités par l'extrait de romarin ont révélé l'absence des modifications structurales conduisant à la lyse du mycélium et, ce qui n'a pas été confirmé, ainsi l'effet de fongicide de cet extrait végétal.

Nos résultats ont révélé également que l'extrait du romarin (100 et 50%), étaient d'excellents inhibiteurs de la sporulation et de la germination de *Fusarium sp*. Leurs taux d'inhibition sont forts pour la sporulation et atteignent les 100% pour la germination. Cela peut être traduit par la déformation des conidies et la lyse de leur contenu par les molécules bioactives renfermées dans ces extraits.

Dans ce sens, plusieurs travaux homologuent avec ces derniers. Il s'est avéré que les extraits de plantes, riches en groupements phénols ont montré également, une activité inhibitrice particulièrement élevée contre la sporulation des champignons **[153].**

L'extrait aqueux de *R.officinalis* réduit la dissémination des conidies qui sont dispersés par le vent **[154].** Ou par *splashing* (dispersion par la pluie de feuille en feuille) qui réduit la propagation de maladie.

III.2.2- Effet d'huile essentiel de *R. officinalis* sur *Fusarium* sp de blé et des agrumes :

Les résultats de l'activité antifongique « *in vitro* » d'HE de *R. officinalis* obtenu à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose montrant que l'activité antifongique de l'HE de *R. officinalis* est en fonction du champignon cible.

L'huile essentielle de romarin a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des deux champignons *(Fusarium* sp*)*, les diamètres, de la croissance de mycélium sont diminué sa chaque fois qu'on augmente la concentration d'huile essentielle.

L'étude réalisée par **[155],** sur l'effet inhibiteur d'huile essentielle d'*Artimesia herba alba* sur deux souches de *Fusarium oxysporum et F.sp*par, a montré que l'activité antifongique est due uniquement aux substances renfermées dans les extraits de l'huile essentielle d'Artimesia *herba alba*.

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote **[156],** et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances **[157].**

L'activité antifongique de l'huile essentielle, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'huile essentielle. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cette huile essentielle **[158].**

Ils ont supposé que la nature lipophile d'huile essentielle les rend plus observables par les mycéliums fongiques que par la gélose de nature hydrophile **[159].**

Le mécanisme d'action des composés phénoliques de l'huile essentielle sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif **[160].**

Les concentrations de l'huile essentielle du *R. officinalis* L. appliquées ont empêché, partiellement (100%,75%,50%,25%), la croissance des souches, ce résultat est comparable à celle de **[161].** Qui ont énoncé que les fortes concentrations en huile essentielle de certains Citrus provoquent des dommages membranaires sévères et une perte d'homéostasie d'où la mort cellulaire ou l'inhibition totale.

Les modifications morphologiques telles que le diamètre et la couleur de mycélium, ont été observés sur déférentes concentrations étaient confirmées par les travaux de **[162].** Sur le mycélium d'*A Niger* sous l'effet des vapeurs de l'huile essentielle de *Cymhopogon nordus.* La perte ou le changement de la couleur peut être corréler avec la perte de la production de mycotoxines.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles par lesquels la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée ont été proposés. Ainsi, **[163 ; 164]** Ont indiqué que les huiles essentielles agiraient sur l'hyphe du mycélium, ce qui provoque la sortie des composants du cytoplasme, la perte de la rigidité et l'affaiblissement de l'intégrité de la paroi cellulaire de l'hyphe, entrainant son effondrement et la mort du mycélium.

III.2.3- Identification des isolats d'*Erwinia amylovora* :

La série des tests, biochimiques, biologiques et sérologiques que nous avons employés lors de cette étude vont nous permettre de se renseigner un peu plus sur les profils des bactéries isolées et sur certaines caractéristiques de leur métabolisme.

A partir d'une culture pure de 24 heures, de chaque isolat, les tests à effectuer pour identifier les espèces d'*E. amylovora* sont : GRAM, oxydation/Fermentation, production du levain, utilisation d'indole. Ces propriétés phénotypiques sont universellement présentes ou absentes chez l'espèce d*'E.amylovora* **[165].**

III.2.4- Effet de l'extrait aqueux de *R. officinalis* sur *Erwinia amylovora* :

L'essai antibactérien a été estimé aussi par la méthode de contact direct, qui consiste à additionner aseptiquement l'extrait dans le milieu de culture.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de contact directe d'extraits aqueux de *R. officinalis*, nos résultats montrent que la souche bactérienne testée est plus au moins résistante. On peut déduire que notre extrait est faiblement actif sur la souche bactérienne testée.

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présent dans ces extraits, y compris les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoides ainsi que d'autre composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libre, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs **[166].**

Pour la souche d'*Erwinia amylovora* ce comportement n'est pas surprenant car elle possède une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière « hydrophile perméabilité barrière » protège des agents toxiques. Composée de lipopolisaccharides, elle peut être franchie plus facilement en présence de certains composés polycationiques qui augmentent la perméabilité des bactéries Gram négatif **[167].**

III.2.5- Effet de l'huiles essentielle de *R. officinalis* sur *Erwinia amylovora* :

Le *R. officinalis*, a montré un large spectre d'action d'après plusieurs auteurs **[168 ; 169** ; **170; 171].** D'autres travaux ont cependant signalé une activité modérée comme ceux **[172].** Ou encore ceux de Sardaigne **[173 ; 174].** Qui ont travaillé respectivement sur l'espèce provenant de Turquie et de Sardaigne. L'HE de notre région (Boufarik) a eu un effet sur la quasi-totalité des souches testées mais à faible intensité.

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle du *R. officinalis* vis-à-vis la bactérie testée.

Nos résultats sur l'activité antibactérienne de l'HE du romarin concordent avec ceux obtenus par **[175].** Dans cette étude, les auteurs ont testé l'huile aromatique du romarin provenant de plusieurs régions de l'Est Algérien : Kherrata (Bedjaia), Boutaleb (Sétif), Bibans (Bourdj Bou-Arriridj), Agmeroual et N'gaous (Batna), et Boussaâda (M'sila). Les diamètres des zones d'inhibition obtenus n'ont pas dépassé les 20 mm, ils se rapprochent de nos résultats et reflètent le potentiel antibactérien modeste voir faible de l'huile essentielle de *R. officinalis* de l'Est Algérien. Par contre, **[176].** Ont signalé la forte activité antibactérienne de l'HE du *R. officinalis* issu du Park national d'El Hamma (Alger).

La sensibilité d'*E.amylovora* à l'huile essentielle de *R. offcinalis* observée dans notre étude a été également constatée par **[119].** Mais nos résultats sont très loins à ceux indiqués par ce dernier qui ont trouvés que l'HE de *R. tournefortii* exerce une fort activité sur *Erwinia amylovora*. On peut céder cette divergence aux facteurs influençant la composition des plantes (lieux et périodes de récolte).

D'après plusieurs travaux, les bactéries à Gram- sont censées d'être plus résistantes que les Gram+, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes **[177 ; 178 ; 179].** Chez les bactéries Gram –, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; riche en lipopolisaccharides dont les charges négatives de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes **[180],** toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolisaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et se faufiler jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable **[158].**

Dans notre étude, l'HE de *R. officinalis* a été moyennement performante, elle a tout de même pu inhiber la quasi-totalité des micro-organismes. Cette activité est attribuée à la présence de

bornéol, l-Verbenone, β-linalol, camphor et à d'autres composés phénoliques. Cette observation a été également faite par **[181].** D'autres travaux, attribuent l'activité antibactérienne du romarin au 1,8 cinéole **[182].** Qui est l'un des composants minoritaires dans notre plante.

Selon **[183].** Ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines HE pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à de faibles taux non négligeables tel que carvacrol, myrthénal, géraniol, connus pour exhiber une activité antibactérienne dans les phénomènes de synergie entre les différents constituants qui peuvent être à l'origine d'une prévisibles par les composés majoritaires.

Ainsi, les effets antimicrobiens des HE ont été expliqués principalement par la présence des terpènes, les hydroxyles des groupements phénoliques sont capables de se lier aux sites actifs des enzymes cibles par des liaisons d'hydrogène. Les alcools terpéniques sont connus par leur fort pouvoir antibactérien, dû à leur solubilité sans l'eau, ce qui leur confère un haut habilité à pénétrer les parois des cellules bactériennes **[119].**

La variabilité des résultats est peut-être due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie de travail et les micro-organismes testés.

Conclusion générale

Parmi les contraintes qui pèsent sur l'agriculture, les maladies et les ravageurs, regroupés sous le terme de « bio agresseurs », rendent nécessaire le développement de méthodes à la fois toujours plus innovantes respectueuses de l'environnement et efficace, à fin délimiter les dégâts et donc les pertes qu'ils occasionnent.

Le présent travail est axé sur la recherche des substances naturelles qui par leurs activités antibactérienne et antifongique pourraient être utilisées pour la protection des plantes.

Cette étude réalisée sur les feuilles de *Rosmarinus officinalis* L, récoltée dans la région de Boufarik, a pour but de mettre en évidence quelques propriétés biologiques de son extrait aqueux et son huile essentielle extraite par hydrodistillation.

Après l'extraction, l'huile essentielle obtenue est de couleur jaune clair avec une odeur forte camphrée et un aspect liquide mobil. Le rendement en huile essentielle obtenu est de l'ordre de 1.25%.

La série des tests, biochimiques, biologiques et sérologiques que nous avons employés lors de cette étude vont nous permettre d'identifier la bactérie isolée et renseigner sur certaines caractéristiques de leur métabolisme.

L'étude de l'effet *in vitro* de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* sur le *Fusarium* sp de blé et des agrumes, a montré que la croissance mycélienne augmente avec l'augmentation de la dose d'extrait aqueux. Ainsi leur l'effet sur la sporulation et la germination, a montré que le taux d'inhibition de sporulation est en fonction des doses. Donc l'extrait aqueux donne un faible effet inhibiteur. Qui empêche la dissémination de champignon.

Suite à l'utilisation de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* sur *Erwinia amylovora*, nous avons constaté que l'extrait aqueux de romarin ne possède pas d'effet bactéricide mais un effet bactéristatique.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *R. officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur la souche *Erwinia amylovora* a démontré que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* est douée d'une activité inhibitrice sur cette bactérie phytopathogène et sur les deux souches de champignons testés (*Fusarium sp* de blé et d'agrumes), ce qui confirme l'efficacité antimicrobienne de l'HE vis-à-vis de ces agents phytopathogènes.

L'inhibition et la régression de la croissance microbienne diffère d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits est expliquée par les variations de leurs compositions chimiques.

En revanche, l'aptitude des extraits de *R. officinalis* L. à inhiber la croissance microbienne est tout à fait différente, cela est marqué par l'activité puissante de l'HE par rapport à l'extrait aqueux.

En comparaison, on peut constater que l'huile essentielle est plus active que celle de l'extrait aqueux. D'après ces résultats, on remarque que *R. officinalis* a des propriétés antimicrobiennes très appréciés et cela justifie par son utilisation dans les traitements traditionnels comme un remède antimicrobien.

Cette étude constitue une première étape pour la recherche de molécules bio pesticides de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. Elle mérite d'être suivie par d'autres études pour confirmer leur activité.

Il serait intéressant de tester l'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. sur d'autres agents phytopathogènes.

Il serait aussi d'intérêt de rechercher et caractériser les molécules bioactives existantes dans cette huile essentielle. Afin de les inscrire à l'avenir dans un projet d'utilisation de « Bio pesticides » en agriculture en vue de préserver la santé humaine et contribuer à la protection de l'environnement.

1. **DEACON.D. W,1997**, Modern mycology basic microbiology, vol 7, 224P.
2. **Brown., Urban., Van de Meene Aml, Hammond-Kosack, 2010 -** The infection biology of Fusarium graminearum: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat spikes. Fungal biology 114, 555-571.
3. **Vanneste J.L. et Eden-Green S.J. (2000).** Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Pp 73-83 in: Vanneste J.L. (ed) Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford 370pp. ISBN 0 85 199 2943.
4. **Doumbouya M., Abo k., Lepengue A.N., Camara B., Kanko K., Aidara D. etKone D., 2012 :** Activités comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et dedeux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraîchères enCôté d'Ivoire. J. Appl. Biosciences ; 50 : 3520-3532.
5. **Lahcini B., 2013**-Lutte biologique par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* .72p.
6. **Taleb-Toudert K., 2015**- Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *Callosobruchus masculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de Doctorat, Université de MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou, Algérie, P.5
7. **BONJEAN et PICARD, 1990-** Les céréales à paille : origine, histoire, économie,sélection. Softword – Groupe ITM, Paris, 208p.
8. **Clement-Grandcourt et Prat., 1970-** Les céréales. Collection d'enseignement agricole. 2ème Ed. PP351-360.
9. **JACQUEMIN Leslie ,2012**. Production d'hémicelluloses de pailles et de sons de blé à une échelle pilote Etude des performances techniques et évaluation environnementale d'un agro-procédé. Thèse de doctorat en Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). 345 pages.
10. **Chellali B. 2007.** Marché mondial des céréales : L'Algérie assure sa sécurité alimentaire.http://www.lemaghrebdz.com/admin/folder01/une.pdf.
11. **Pena L., Cervera M., Fagoaga C., Romero J., Juarez N.J., Pina J.A. et Navarro L. (2007).** Citrus. Biotechnology in agriculture and forestry. ***60 Transgenic crops,*** Volume ed. T Nagata; H. Lorz and JM. Widholm.
12. **Praloran J.C. (1971).** Les agrumes. ***Techniques Agricoles et productions Tropicales.*** Ed. G.P. Maison neuve et Larose. 565p.
13. **Ferhat M.A.,MeklatiB.Y.et Chemat F.2010**-Citrus d'Algerie:les huiles essentielles et leurs procèdés d'extraction .Ed.OPU.n°5130.Alger 157p.
14. **I.T.A.F.,2002**-Relevés climatiqueq.Manuscrit I.T.A.F.V.,Boufarik,18p.
15. **M.A.D.R.P., 2013** - L'agriculture dans l'économie nationale, Ed. Ministère de l'agriculture, 48 p.
16. Tous-les-fruits.com. *Pomme*. http://tous-les-fruits.com/fruit-320.html, consulté le 19/07/2009.
17. **Robinson JP**, **Harris SA, Juniper BE. 2001**. Taxonomy of the genus Malus Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, Malus x domestica Borkh. Plant. Syst. Evol. 226: 35–58.

18. **Luby J. 2003.** Taxonomic classification and history. In: Ferree D, Warrington I, eds. Apples,botany, production and uses. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1–14.
19. **Leslie** J.F., Summerell B.A., **2006.** The Fusarium Laboratory Manual; Blackwell Publishing : Oxford, UK. Ltd, Iowa.p. 109.
20. **Belabid L., 2003**. La fusariose vasculaire de la lentille (Lens culinaris Med.) dans le Nord-Ouest Algérien : Morphologie et diversité génétique chez Fusarium oxysporum (Schlecht.) Emend. S.& H. f. sp. lentis (Vasud. & Srini.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
21. **Nelson** P.E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O., **1983**. Fusarium species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, 193 pp.
22. **Booth C., 1971**. The genus Fusarium. Kew (surrey): Common Wealth Mycologica Institute, England. 137pp.
23. **Llorens A.,** Hinojo M.J, Mateo R., Gonzalez-Jaeén M., Valle-Algarra F.M., Logrieco A., Jiménez M., **2006**. Characterization of Fusarium spp isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). Int J Food Microbiol, 106(3): 297-306.
24. **Thrane U., 2001.** Developments in the taxonomy of Fusarium species based on secondary metabolites. In : Fusarium. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici race 1 and race 2. Euphytica, 93 : 145–153.
25. **Richard M., 2004**. La Fusariose chez les céréales dans le Canadaatlantique.1-3.http://www2.gnb.ca/content/dam/gnb/Departments/10/pdf/Agriculture/FieldCrops-GrandesCultures/FUSARI%20f3.pdf.
26. **Wegulo S., Jackson T A., Baenziger S., Carlson M. et Hernandez J., 2008**. Fusarium Head Blight of Wheat. 8p.
27. **Mathieu CB., Nathalie S., Denis Pageau M Sc. et Sylvie R., 2012**. Pour en savoirplus sur la Fusariose.7p.
28. **Prescott JM., Burnett PA., Saari EE., Ransom J., Bowman J W., Milliano do.,Singh RP. et Bekele G., 1987.** Maladies at ravagours du blé **:** Guide d'identificationau champ. CIMMYT. Mexico, D.F., Mexico. 135p.
29. **Pirgozliev SR., Edwards SG., Hare MC. et Jenkinson P., 2003.** Strategies For the control of Fusarium head blight in cereals / European Journal of Plant Pathology. 109.731–742.
30. **Ballois N., 2012**. Caractérisation de la diversité des espèces de *fusarium* et de leur potentiel mycotoxinogene sur céréales françaises. Master Fage Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement. Spécialité. BIPE. 36p.
31. **MCMULLEN M. P., STACK R. W.2008** « *Fusarium* head blight (Scab) of small grains » [En ligne]. North Dakota StateUniversity, Plant Pathology Department, 2011. [Consulté le 12 juillet 2012]. Disponible sur le web: <
32. **Brown., Urban., Van de Meene Aml, Hammond-Kosack, 2010 -** The infection biology of Fusarium graminearum: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat spikes. Fungal biology 114, 555-571.

33. **Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL, 2004**. Survival and Inoculum Production of Gibberella zeae in WheatResidue. *Plant Disease* **88**, 724-730.
34. **Xu XM, Nicholson P, 2009**. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Reviewof Phytopathology* **47**, 83.
35. **Mc Mullen M, Jones R, Gallenberg D, 1997.** Scab of wheat and barley: A Re-emerging disease of devasting impact. *Plant Disease* **81**(12), 1340-1348.
36. **O'DONNELL K., WARD TJ., GEISER DM., CORBY KISTLER H. et AOKI T.,2004.** Genealogical concordance between the mating type locus and seven othernuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct specieswithin the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*. 41, (6). 600–623.
37. **Zillinsky FJ., 1983.** Maladies communes des céréales à paille : Guide d'identification. Mexico, CIMMYT. 141 p.

38. **Trail F., Xu H., Loranger R., Gadoury D., 2002**-Physiological and environmental aspects of ascosporedischarge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), Mycologia, Volume 94, Issue 2, Pages 181-189.
39. **Bai G, Shaner G, 1994.** Scab of wheat: Prospects for control. Plant Disease **78**, 760–766.
40. **Arsan MR, Eraky Amal MI, 2011.** Aggressiveness of certain *Fusarium graminearum* isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production. *Plant Pathology* **10**(1), 36-41.
41. **Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM,Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J, 2005.** Predominance and association of pathogenicfungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* **112**,143-154.
42. **Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F. 2004.** *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects ofcultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *PlantScience* **166**, 1389-1415.
43. **Fernando WGD, Paulitz TC, Seaman WL, Dutilleul P, Miller JD, 1997**. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology* **87,** 414-421.
44. **Mascher F., Michel V. et Browne RA., 2005.** Sélection de variétés de blé et detritica le résistantes à la fusariose sur épi. Revue suisse Agric. 189-194.
45. **Martin L., Yves D. et Sylvie R., 2007.** Fusariose de l'épi chez le blé et l'orge.CÉROM Saint-Bruno-de-Montarville, bulletin technique : phytopatologie : 2. (1). 5p.
46. **Trail F, 2009.** For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology* **149**(1), 103-110.
47. **Osborne LE, Stein JM, 2007.** Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *InternationalJournal of Food Microbiology* **119**, 103– 108.
48. **Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B, Messens K, Höfte M, Haesaert G, 2009**.*Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population

diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 445–458.

49. **Leonard KJ, Bushnell WR, 2003.** *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.
50. **Walter S, Nicholson P, Doohan FM, 2010**. Research review: Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* **185**, 54–66.
51. **Brown., Urban., Van de Meene Aml, Hammond-Kosack, 2010 -** The infection biology of Fusarium graminearum: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat spikes. Fungal biology 114, 555-571.
52. **Doohan FM, Brennan J, Cooke BM, 2003**. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic tocereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 755–768.
53. **Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G and Alabouvette C., 1995.** Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phtopathology, 85: 579-585.
54. **Scott J.C., Gordon T.R., Kirkpatrick S.C., Koike S.T., Matheron M.E., Ochoa O.E., Truco M.J., and Michelmore R.W., 2012.** Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. California Agriculture, 66:20-24.
55. **Miguel A., Maroto J.V., San Bautista A., Baixauli C., Cebolla V., Pascual B., Lopez-Galarza S., Guardiola J.L., 2004.** The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt. Sci. Hortic, 103 : 9–17.
56. **Fravel D., Olivain C., Alabouvette C., 2003.** *Fusarium oxysporum* its biocontrol. New Phytologist, 157: 493–502.
57. **Huang C.C., Lindhout P., 1997.** Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicirace* 1 and race 2. Euphytica, 93: 145–153.4.
58. **Hawkins L.K., Dane F., Kubisiak T.L., Rhodes B.B., Jarret R.L., 2001.** Linkage mapping in a watermelon population segregating for *Fusarium* wilt resistance. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126:344-350.
59. **Schneider K.A., Grafton K.F., Kelly J.D., 2001.** QTL Analysis of Resistance to *Fusarium* Root Rot in Bean. Crop Science, 41: 535–542.
60. **Halila I., Cobos M.J., Rubio J., Millán T., Kharrat M., Marrakchi M., Gil J., 2008.** Tagging mapping a second resistance gene for *Fusarium* wilt race 0 in chickpea. European Journal of Plant Pathology, 124:87-92.
61. **Diener A.C., Ausubel F.M**., **2005.** Resistance to *Fusarium oxysporum* a dominant Arabidopsis disease-resistance gene is not race-specific. Genetics, 171: 305-321.
62. **Sidhu G.S., Webster J.M., 1979.** A study of heterokaryosis and its influence on virulence in *Fusarium oxysporum lycopersici*. Can. J. Bot, 57: 548–555.
63. **Beckman C.H., 1987.** The Nature of Wilt Diseases of Plants. (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press).
64. **Cai G., Gale L.R., Schneider R.W., Kistler H.C., Davis R.M., Elias K.S., Miyao E.M., 2003.** Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology, 93: 1014–1022.
65. **Bolton A.T., 1984.** Root rot of *Ficus benjamina*. Plant Dis, 68: 816–817.

66. **Song W., Zhou L., Yang C., Cao X., Zhang L., Liu X., 2004.** Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Prot, 23: 243–247.
67. **Amini J., Sidovich D.F., 2010.** The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. J. Plant Prot. Res, 50: 172–178.
68. **Gerhardson** B., **2002.** Biological substitutes for pesticides. Trends Biotechnol, 20: 338-343.
69. **Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M., 2004**. *Trichoderma* species oportunistic,avirulent plant symbionts. Nature Reviews of Michrobiology, 2:43-58.
70. **Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Sahai V., Prévost D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., 2007.** Benchscale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. Enzyme and Microbial Technology, 41 (6): 764–771.
71. **Wagacha JM, Muthomi JW, 2007.** *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin productionand their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* **26**, 877-885.
72. **Thomson, S. V., 2000**. Epidemiology of fire blight. Pp. 9-36. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Vanneste, J. L. (ed.). CABI publishing. Wallingford. UK.
73. **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2013.** Diagnostics PM 7/20 (2) Erwinia amylovora. EPPO Bulletin, 43 : 21–45.
74. **Philion V. (2014).** Fiches 104 - 106, Le feu bactérien. In : Guide deréférence en production fruitièreintégrée pour les producteurs de pommes du Québec. Edition CFP, Pageau C. F. ; IRDA, Poulin D.,Québec, pp ; 403-422.
75. **Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C, Geider K (1998)** Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwiniaamylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. Phytopathology 88:416-421.
76. **Office fédéral de l'agriculture OFAG, (2007**), Lutte contre le feu bactérien en Suisse.
77. **Palacio-Bielsa A, Rosello M, Liop P, Lopez MM (2011)** Erwinia spp. From fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. Trees 10.1007/s00468-011-0644-9.
78. **OEPP/EPPO Global Data base, 2012**. *Erwinia amylovora* (ERWIAM) distribution for *Erwinia amylovora*.
79. **Van Der Zwet.T. Keil. H. L, 1979.**Fire blight. A bacterial disease of *rosacuous*plants.U.S. Dept. Agr. Handb. 510. 200p.
80. **Bennet RAE; Billing, 1978-***Capsulation and virulence in Erwinia amylovora. Ann.Appl. Biol. 89: 41-45.*
81. **Agrios, 2004**. Plant pathology, Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-044565-4. Ed 05. p 641-647.
82. **Raetz CRH; Whitfield C, 2002-***Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem*71:635-700.
83. **Linda M; Sherwood; Joanne M; Willey; Christopher J; Woolverton, 2010-** Microbiologie 59 :578.

84. **Merkaert C; Thiry ME; Thiry GC; Ledoux L, 1982-***Characterization of plasmids present in Erwinia amylovora. Archives of International Journal Physiology And Biochememistry 90 : pp54.*
85. **Vanneste JL, 1983-**Etude du plasmide d'*Erwinia amylovora. Son rôle dans le pouvoir pathogène D.E.A, Faculté des sciences de paris XI. Pp18.*
86. **Falkestein H; Belleman P; Walter S; Zeller W; Geider K, 1988-***Identification of Erwinia amylovora, the fire blight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. Applied and Environmental Microbiology 54: 2798-2802.*
87. **Laurent J; Barny MA; Kotoujansky A; Dufriche P; Vanneste JL, 1989-***Characterization of an ubiquitous plasmid Erwinia amylovora. Molecular Plant-Microbe Interaction 2: 160-164.*
88. **Verdonck L; Margaert J; Rijckaert C; Swings J; Kesters K; De Ley J, 1987-***Genus Erwinia, numerical analysis of phenotypic features. International Journal of Systematic Bacteriology 37 : 4-18.*
89. **Gautier M., 1988 :** La culture fruitière. Volume 2, les productions fruitières. Ed.J.B.Baillière, Paris, 452 p.
90. **Hummer KH, Janick J (2009)** Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In: Folta KM, Gardiner (eds) Genetics and genomics of Rosaceae. Series plant Genetics and Genomics: Crops and models, vol 6, Springer, New York, pp 1-17.
91. **AGyours (2014).** Insectes et maladies dans la pomme. http://www.agyours.com/?portfolio=insecteset-maladies-dans-la-pomme (consulté le 14/05/2014).
92. **Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E ,1998.** First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*. Trends Biotech 16 :203-210
93. **Malnoy M, Faize M, Venisse JS, Geider K, Chevreau E ,2005.** Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. Plant Cell Rep 23:632-638
94. **Borejsza-Wysocka E.E, Malnoy M, Beer SV, Aldwinckle HS, 2006.** Increased resistance to fire blight in apple plants by silencing DspE-interacting proteins. Phytopathology 96: S176
95. **Wilson M. and Lindow S.E, 1993.** Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossom. *Phytopathology*, 83:117-123.
96. **Vanneste J.L., 1996.** Honey bees and epiphytic bacteria to control fire blight, a bacteria disease of apple and pears. *Biocontrol News and Information 17: 67N-78N*.
97. **Johnson, K.B., Stockwell, V.O., 2000**. Biological control of fire blight. In: Vanneste, J.L. (Ed.), Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia amylovora. CAB International, Wallingford, UK, pp. 319–337.
98. **Pusey P.L., Stockwell V.O, Mazzola M, (2009).** Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 99, 571–581.
99. **Boullard (2010).** BOUDJEMAA Nour Elyakin et BEN GUEGUA Hadjer, L'effet antibactérien de Nigella Sativa. Université Kasdi Merbah Ouargla.

100. **Goetz P. et Ghedira K., 2O12 :** Phytothérapie anti-infectieuse. Ed. springer-Verlag, France, Paris. p p 341-347.
101. **Rameau J.C. et Mansion D., Dume G., 2008 :** Flore forestière françaises : guide écologique illustré. Région méditerranéenne. Ed Foret privée française. 2426p.
102. **Besombes, Colette, 2008 :** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Thèse doctorat, université de la ROCHELLE.
103. ANONYME, 1996 : QA International Collectif : L'Encyclopédie visuelle des aliments. Ed Québec Amérique
104. **Quezel P. et Santa, S., 1963.** La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed CNRS. Paris. 360-361 p
105. **Bellakhdar, J. (1997)** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris,764 p.
106. **Beloued, A. (1998)** Plantes médicinales d' Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.
107. **Gonzalez-Trujano**, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz,F.J. **(2007)** Evaluation of the antinociceptive effect of Rosmarinus officinalis L. using three different experimental models in rodents. J Ethnopharmacol. 111 : 476-482.
108. **WECKESSER et al (2007).** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine. (In press).
109. **SACCHETTI, et ses Collaborateurs (2005).** Growing in Argentina.Bioresource Technology. (In press).
110. **Lemonica I. P., Damasceno D. C. et Di-Stasi L. C. 1996**. Study of the embryotoxic effects of an extract of Rosmary (Rosmarinus officinalis). Brazilian journal of medical and biological research. 29 (2): 223-227.
111. **Ibañez E.**, Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero S. et Reglero G. **2000.** Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidantsfrom Rosmary (Rosmarinus officinalis L). Journal of Agricult ural and Food chemistry, 48(9): 4060-4065.
112. **Cheung S. ET Tai J. 2007.** Anti-proliferative and antioxidant propreties of rosmary Rosmarinus officinalis. Oncology reports. 17 (6): 1525-1531.
113. **Singletary K. W. et Nelshoppen J. M. 1991**. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. Cancer lettres. 60 (2) : 169-175.
114. **Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. et Pfeifer A. M. 1995.** Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchical cells. Carcinogenesis., 16 (9) : 2057-2062.
115. **Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. 1993**. Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. Journal of natural products., 56 (8) : 1426-1430.

116. **Devet P., Rouxel F. ,1997**- Détection et isolement des champignons du sol, Paris. Cedex07, p147.

117. **King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954)** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and ClinicalMedicine* 44, 301-307.

118. **Suslow, T.V., Schroth, M.N. & Isaka M. (1982)** Application of a rapid method for Gram differenciation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72,917-918.

119. **Ammam S ., 2014**-Évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* de la région de Bouira .96p.

120. **Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D.C. (1990)** *Methods in phytobacteriology*. *A/ademiai Kiad* 568p. Budapest (HG).

121. **Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001)** *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* APS Press. Third edition 373p. St Paul, Minnesota (US).

122. **Hugh, R. & Leifson, E. (1953)** The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology* 66, 24-26.

123. **Schaad N.W., Hildebrand D.C., Schoth M.N., Sands D.C., 1988**. In plant pathologicbacteria, laboratory guide for identification. ed N°02. N. W. APS Minnesota. USA. 37- 53.

124. **Lelliott, R.A. & Stead, D.E., (1987)** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blac/well Scientific Publications Volume 2. Oxford (GB).

125. **Grainge M.& Ahmed S., 1988:** Handbook of plant with pest control properties. Wiley, New York 2ed edition: 470p.

126. **Krebs H., DornB. &Forrer H.R., 2006 :** Lutte contre le mildiou de la pomme de terre avec des préparations à base de plantes. Revue suisse Agric. 38 (4) : 203-207p.

127. **LUCCHSI-M.E(2005).**ExtractionSansSolvantAssistéeparMicro-ondesConceptionetApplication à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23, 52.

128. **Lucchesietal,2004).LUCCHSI.M.E.,CHEMATF.andSMADJAL.J.(2004).**Fl avourand Fragrance Journal Flavour Fragr .J. ; 19: 134-138

129. **AFNOR,** 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57p.

130. **Ben Hamida N., M.M. Abdelkafi, R. Ben Aissa, M. Chaabouni, *J. Essent. Oil. Res*, 2001**, EXTRACTION ET ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE *Rosmarinus Officinalis cueillie* DANS TROIS REGIONS DIFFERENTES DE LA TUNISIE13, 295.

131. **Ayadi S., D. Ben Salah, A. Hedhili, M. Abderrabba, *Biosc. Biotech. Res.* Asia, 2005**, EXTRACTION ET ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE *Rosmarinus Officinalis cueillie* DANS TROIS REGIONS DIFFERENTES DE LA TUNISIE3(1), 461.

132. **Mishra A.K. & Dubey N.K., 1994:** Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Applied and environmental microbiology 60: 1101-1105p.

133. **Sy A.A., 1976 :** Contribution à l'étude de Pyricularia oryzae Cav. Recherche *in vitro* d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse : 236 p.

134. **Rollan M.C., Mónaco C.I. & Nico A., 1999 :** Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *S. rolfsi*. Investigación Agropecuaria, Productividad y Protección Vegetal 14 : 33-48p.

135. **Hmouni A., Hajlaoui M.R. & Mlaiki A., 1996.** Résistance de Botrytis cinerea aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. OEPP/EPPO Bull. 26 **:** 697–705p.

136. **Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. & El Mahjoub M., 2005:** Effet inhibiteur in vitro et in vivo du Trichoderma harzianum sur Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **9**(3) : 163-171p.

137. **Berber F., Ouazzani T ouhami M., Badoc A. & Douira A., 2009 :** Antagonisme *in vivo* de deux *Trichoderma* à l'égard de quatre espèces de *Bipolaris* pathogènes sur le sorgho. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 148 : 93-114p.

138. **TOTY A A., GUESSENND N., BAHI C., KRA A. M., OTOKORE D. A. et DOSSOM., 2013 :** Évaluation in vitrode l'activité antibactérienne del'extrait aqueux de l'écorce de tronc de Harungana madagascariensissur la croissance de souches multirésistantes.Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, V 82, 2013, p. 12 – 21

139. **BENJELALI. B, TANTAOUI. E.A et ESMAIL ALAOUI.M, 1986,** Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, Plante médicinales et phytothérapie, 20, 155, 167.

140. **Chao.S.C, Young.D.G, Oberg.G.J, 2000,** screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria , fungi and virus .J.Essent oil Res , vol 12(sep/oct 2000) PP639-649.

141. **PONCE G.2003**, mining the essential oils of the anthemideae African journal of biotechnology, 3 (12), 706 – 720.

142. **Auger J. & Thibout E., 2002 :** substances soufrées des Allium et des Crucifères et leurs potentialités phytosanitaires. In Regnault-Roger C., Philogène B J.R & Vincent C. Biopesticides d'origine végétale. Tec & Doc, Paris : 77-96p.

143. **Haddouchi F. & Benmansour A., 2008 :** Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Article de synthèse, Université de Tlemcen. Les techniques de laboratoire N°8 : 8p.

144. **Cardenas-Ortega N.C., Zavala-Sanchez M.A., Aguirre-Rivera J.R., Perez-Gonzalez, C. & Perez-Gutierrez, S., 2005:** Chemical composition and antifungal

activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* gray. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 4347–4349p.

145. **Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro, L., Goncalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A. & Martinez-de-Oliveira, J., 2006.** Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species, Journal of Medical Microbiology 55(10): 1367–1373p.

146. **Makhloufi A., Moussaoui A., Lazouni H.A., Hasnat N. & Abdelouahid D.E., 2011:** Antifungal activity of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. and its impact on the conservation of a local variety of dates during storage. Medicinal Plants- International Journal of Phytomedicines and Related Industries. 3, Issue: 2. ISSN: 0975-6892.:129-134p.

147. **Davidson P.M. & Naidu A.S., 2000:** Phyto-phenols. In: A.S. Naidu, Editor,Natural Food Antimicrobial Systems, CRC Press, Boca Raton, FL: 265–294p.

148. **Del Campo J., Amiot M.J.& Nguyen C., 2000:** Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection 63 (10): 1359–1368p.

149. **Djenane D., Sánchez-Escalante A., Bel-trán J.A. & Roncalés P., 2002:** Ability of α-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. Food Chemistry 76 (4): 407–415p.

150. **Mehmet M.Ö. & Chalchat J-C., 2008:** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey, International Journal of Food Sciences and Nutrition 59(7-8):691-698.

151. **Centeno S., Calvo M.A., Adelantado C. & Figueroa S., 2010:** Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. Pakistan Journal of Biological Sciences; PJBS. 2010 May 1;13(9):452-5.

152. **Goussous S.J., Abu-El-Samen F.M. & Tahhan R.A., 2010:** Archives of Phytopathology and Plant Protection. Jordan. 43: 1745-1757p.

153. **Inouye S., Watanabe M., Nishiyama Y., Takeo K., Akao M. &Yamagushi M., 1998.** Anti-sporulation and respiration inhibitory effect of essential oils on filamentous Fungi-Mycoses 41: 403-410p.

154. **Fernando WGD, Paulitz TC, Seaman WL, Dutilleul P, Miller JD, 1997**. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology* **87,** 414-421.

155. **KOLAI N, SAIAH F. BOUDIA A, 2012.** Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle d'*Artimesia herbaalba* sur deux souche de Fusarium *Oxysporum*, *F.sp*. radicis-lycopersici. INSSN, pp2170-1318.

156. **Chami., 2005** - Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composes majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc. P 266.

157. **Prasad et Kapoor, 2004-** Multidrug resistance in yeast Candida. P 215-248.

158. **GIORDANI R., HADEF Y., KALOUSTIAN J. 2008**. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia ,79 : pp199-203.

159. **Dorman HJD. and Deans SG., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88(3):** 308-316.

160. **CELIMENE C.C., MICALES J.A., FERGE L. and YOUNG R.A., 1999**. Efficacy of pinosylvins against white rot and brown rots fungi. Holz forschung, 53: pp491- 497.

161. **URIBES., RAMIREZ T., PENA A. 1985.** Effects of B. pinene on yeast membrane functions. Journal of Bacteriology, pp1195-1200.

162. **DE BILLERBECK V.G., ROQUES C., VANIERE P. et MARQUIER P., 2002**. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Revue hygiene, 10(3): pp248- 254.

163. **Lucini E. I., Zunino M. P. and Zygadlo J. A., 2006:** effect of monoterpenes on lipidcomposition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. Journal ofphytopathology. Vol154, Issue 7-8: 441 - 446.

164. **El Badawy M. E. I. and Abdelgaleil S. A. M., 2014:** Composition and antimicrobialactivity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. Industrial crops and products; 52: 776 – 782.

165. **Paulin JP (2000)** *Erwinia amylovora*: general characteristics. In: Vanneste JL (ed) Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, pp 87–115.

166. **Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., and Mata R. (1992).** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **35 :** 275-283.

167. **Mann C. M., Cox S. D. et al., 2000.** "The outer membrane of Pseudomonas aeruginosa NCTC 6749 contributes ta its tolerance to the essential ail of Melaleuca alternifolia (tea tree ail)" Lett Appi Microbiol 30- 4: (294-297).

168. **Erdogrul OT.,** 2002. Antibacterial activities of some plant extracts used in Folk medicine.*Pharm. Biol.* **40:** 269-273.

169. **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei MB., Taghizadeh M., Astaneh SA., Rasooli I., 2007**.Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and*Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102:** 898-904.

170. **Jiang Y., Wua N., Fua YJ., Wang W., Luo, M., Zhaoa CJ., 2011**. Chemical composi-tionand antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol.Pharmacol*. **32 :**63–68.

171. **Khosravi AR., Shokri H., Farahnejat Z., Chalangari R., Katalin M., 2013.** Antimy-coticefficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained frompatients with dermatophytosis. *Chin. J. Nat. Med.* **11:** 43–48.

172. **Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC., 2007**.Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus*

officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **100:** 553–559.

173. **Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson DJ., Arlorio M., 2004**. Chemicalcomposition, plant genetic differences, antimicrobial and antifu ngal activity investigation ofthe essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**52(11):** 3530–3535.

174. **Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C., 2005**. Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem*. **53:** 6939- 6946.

175. **Lograda T., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G., 2014.** Characteristics of essential oilsof *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine.* **2:** 794-807.

176. **Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa HD., 2007.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Natural Comp.***43(4):** 487-490.

177. **Inouye S., Takazawa T. and Yamaguchi H., 2001.** Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact.*Journal of Antibacterial Chemotherapy*. **47:** 565-573.

178. **Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C., 2005**. Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem*. **53:** 6939- 6946.

179. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G., 2006.** Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem*. **54:** 1822-1828.

180. **Nikaido H., 2003.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.*Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67(4):** 593-656.

181. **Santoyo S., Lioria R., Jaime L., Ibanez E., Senorans FJ. and Reglero G., 2006.Supercritical** fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from*Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. *European Food Res. Technol.***224:** 75–81.

182. **Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013.** Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science.* **5(6):** 729-739.

183. **DELAQUIS, 2002**.Microbial dynamics an dinteractions in the sperm sphere.Ann. Rev. Phytopathol., 42, 271-309.

Annexe 1 : « Le matériel utilisé lors de l'expérimentation »

1-L'appareillage :
- Balance de précision.
-Une hotte ·
-Une étuve.
-Four pasteur.
- Une balance électrique.
- Un réfrigérateur.
- Plaque chauffante.
- Centrifugeuse.
- Autoclave.
- Agitateur de tubes : vortex.
- Un microscope optique.
- Microscope à épi fluorescence.
- Hydro distillateur.
- Agitateur Ping Ponge.
- Clevenger.

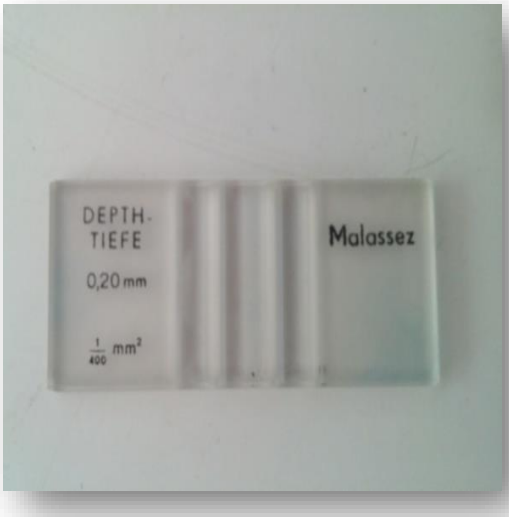
2- Matériel et Verrerie :
- Papier aluminium.
- Tubes à essai en verre.
- Seringues stériles.
- Disque en papier.
- Flacons.
- Béchers.
- Pipette pasteur.
- Pince de laboratoire.
- Anse stérile.
- Fioles.
- Portoir pour tubes.
- Ampoule à décanter.
- Etiquettes.
- Spatule.
- Erlenmeyer de 1000 ml et de 500 ml.
- Pipettes graduées.
- Les fioles.
- Des tubes à essai.
- Papier Wattman stérile.
- Des boites de Pétri.
- Un scalpel.
- Un compteur manuel.
-Une gaze.
- Couvercle.
-Coton.
- Lame de microscopie.
- Un bec Bunsen.

3-Réactifs et préparations :
- Chlorure de sodium.
-Alcool (éthanol à 70°).
-Solution aqueuse à 3% de KOH
- Réactif de Kovac.
- Na_2HPO_4 (12 H_2O).
-NaH_2PO_4 (02 H_2O).
-Na Cl.
- Violet de gentiane.
- Solution de lugol.
- Solution de fuschine basique.
-Oxalate de N, N, diméthyle paraphénylène diamine.
-Peroxyde d'hydrogène (3%).
-Eau physiologique stérile (0.85 %).

Annexe 2 : « Les appareils utilisés »



Autoclave



cellule de Malassez



Etuve bactérienne



Etuve de mycologie



La hotte



Four pasteur



Agitateur Ping Ponge



Agitateur vortex des tubes.



Centrifugeuse



microscope à épi fluorescence.



Clevenger

Annexe 3 : « Milieux de culture utilisés »

- **Milieu PDA :**

La composition du milieu est comme suit :

- 200 g de pomme de terre
- 20 g de Glucose
- 20 g de Gélose (Agar agar)
- 1000 ml d'eau distillée

Une fois le milieu est prêt, il est mis dans un autoclave pendant une durée de 20 à 30 minutes à 120°C pour stériliser son contenu**.**

- **Milieu King B:**

-Protéose - peptone n°3 (Difco)..... 20,0 g
-Glycérol..... 10,0 g
-Phosphate de potassium dibasique ..... 1,50 g
-Sulfate de magnésium heptahydraté..... 1,50 g
-Agar bactériologique ..... 15,0 g

Après autoclavage à une température >à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir être coulé en boîtes de Petri. Avant de couler le milieu, incorporer 0,05 g de cycloheximide dissout dans de l'éthanol et stérilisé par filtration.

- **Milieu levane :**

-Extrait de levure .....2,0 g
-Bactopeptone (Difco) .....5,0 g
-Saccharose .....50,0 g
-Chlorure de sodium ..... 5,0 g
-Agar bactériologique ..... 20,0 g

Ajuster le pH à 7,2. Après autoclavage à une température >à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Pétri.

- **Milieu de Hugh et Leifson :**

-Bacto tryptone ..... 2,0 g
-Phosphate de potassium dibasique ..... 0,3 g
-Chlorure de sodium..... 5,0 g
-Bleu de bromothymol..... 0,03 g

-D(+)-glucose ..... 10,0 g

-Agar bactériologique type A ..... 3,0 g

Après autoclavage à une température >à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

- **Milieu urée-indole :**

-L-tryptophane ..... 0,3 g

-Dihydrogénophosphate de potassium ..... 0,1 g

-Hydrogénophosphate de dipotassium ..... 0,1 g

-Chlorure de sodium ..... 0,5 g

-Urée 2,0g

-Rouge de phénol (sol. à 1% dans éthanol) 0,25 g

Dissoudre le tryptophane dans l'eau chauffée à environ 80°C, laisser refroidir suffisamment pour pouvoir rajouter les autres produits. Après dissolution, stériliser le milieu par filtration.

- **Tampon PBS :**

-Chlorure de sodium ..... 8,0 g

-Chlorure de potassium ..... 0,2 g

-Hydrogénophosphate de disodium ..... 2,9 g

-Dihydrogénophosphate de potassium. 0,2 g

Le tampon est autoclavé à une température >à 121°C pendant environ 20 minutes.

- **Milieu arginine :**

-Peptone (bacto) ……1g

-Chlorure de Na (Na Cl) ……5g

-Phosphate de K dibasique ($k_2 HPO_4$) ……0.3g

-Agar(Bacto) ……..3g

-Rouge phénol (sol'n de 0.1%)……10 ml

-Arginine HCL ……10g